Aus dem Hygiene - Institut der Universität Tübingen
Abteilung für medizinische Virologie und Epidemiologie der Viruskrankheiten
Direktor: Professor Dr. med. H.- J. Gerth

UNTERSUCHUNGEN ZUR ZÜCHTUNG, STRUKTUR, ANTIGENOPTIMIERUNG UND SEROEPIDEMIOLOGIE DES RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Theoretische Medizin)
der Eberhard–Karls–Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
WERNER HEINRICH WURSTER
aus Mainhardt

1979

Aus dem Hygiene - Institut der Universität Tübingen
Abteilung für medizinische Virologie und Epidemiologie der Viruskrankheiten
Direktor: Professor Dr. med. H.- J. Gerth

UNTERSUCHUNGEN ZUR ZÜCHTUNG, STRUKTUR, ANTIGENOPTIMIERUNG UND SEROEPIDEMIOLOGIE DES RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Theoretische Medizin)
der Eberhard–Karls–Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
WERNER HEINRICH WURSTER
aus Mainhardt

1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Prof. Dr. med. H. Haselmann

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. H.-J. Gerth

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. W. Höfler

Gedruckt bei Firma H.- J. Köhler, 7400 Tübingen, Neue Str. 11

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. H.-J. Gerth für die Überlassung des Themas sowie für seine stets freundliche Unterstützung und wohlwollende Förderung bei der Durchführung dieser Arbeit.
Herzlich danken möchte ich für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen Herrn Dr. H. Frank und Herrn M. Claviez vom Max-Planck-Institut für Virusforschung, Tübingen. Letzterem und Frl. Klein bin ich außerdem für die Präparationen des gezüchteten Virusmaterials sehr dankbar.
Ebenfalls dankend erwähnen möchte ich Herrn Prof. Dr. med. H. Haselmann vom Institut für wissenschaftliche Mikroskopie, Tübingen, für die Aufnahme der lichtmikroskopischen Bilder.
Meinem Bruder Wilfried verdanke ich die mathematische Untersuchung der Ergebnisse meiner serologischen Studien auf Signifikanz.
An dieser Stelle sei außerdem Dank gesagt all jenen, die mir Vorbild, Lehrer und Förderer sind und waren.

Meinen Eltern und
meiner lieben Anni
in Dankbarkeit gewidmet

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

Seite

I. Einleitung 1

1. Allgemeine Vorstellung und Beschreibung des RS-Virus und des von ihm verursachten (alters-spezifischen) Krankheitsbildes 1
2. Klassifizierung des RS-Virus 1
3. Historisches zum RS-Virus 2
4. Vorkommen und geographische Verbreitung des RS-Virus 3
5. Das klinische Bild einer RSV-Infektion 3
6. Pathogenese der RSV-Infektionskrankheit und virusbedingte, pathohistologische Veränderungen 4
7. Hypothesen zur Pathogenese der durch RS-Viren bedingten Infektionskrankheit 5
8. Epidemiologie der RSV-Infektionskrankheit 5
9. Diagnose der durch RS-Viren bedingten Infektionskrankheit 7
10. Das Problem der Impfung und Herstellung einer brauchbaren Vakzine gegen das RS-Virus 11

II. Material und Methoden 14

1. Material und Zubehör 14
2. Seren 14
3. Virusmaterial 15
4. Gewebekulturzellen 15
5. Medien 15
6. Apparate 15
7. Versuchstiere 16
8. Pufferlösungen 16
9. Zusammensetzung des Serummaterials 18
10. Züchtung von Gewebekulturzellen für die RS-Virus-Vermehrung 19

Seite

11. Passagierung von Gewebekultur-Zellen 20
12. Züchtung des RS-Virus auf Wirtszellen permanenter Zellinien (VERO- und HEP-2-Zellen) 21
13. Lichtmikroskopie 22
14. Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) und Rasterelektronenmikroskopie (SEM) 22
15. Verschiedene Präparationsmethoden zur Gewinnung von RSV-Antigenen 23
16. Komplementbindungsreaktion (KBR) 23
16.1. KBR-Vorversuch zur Austestung der für den KBR-Hauptversuch benötigten Komplementkonzentration 24
16.2. Inaktivierung der Seren 24
16.3. Technische Durchführung der KBR auf den Mikrotiterplatten 25
16.4. Herstellung des hämolytischen Systems für die KBR 26
17. Kontrollen 27

III. Ergebnisse 28

1. Optimierung der RSV-Antigen-Präparation durch Anwendung verschiedener Präparationsmethoden 28
1.1. RSV-Antigen-Präparation zur Herstellung des CF-Antigens nach der Methode von TOMIYANA (1975) 28
1.2. Eigene Modifikationen der Präparationsmethode von TOMIYANA zur Optimierung des RSV-Antigens 29
1.3. Herstellung von RSV-Antigen nach der sog. "Inkubationsmethode" 32
1.4. Gewinnung von Anti-RSV-Immunserum von Meerschweinchen und Darstellung der Antikörper-Titer als Funktion der Zeit bei Verwendung zweier unterschiedlich präparierter RSV-Antigene 35

Seite

1.5. Weitere Variation der von TOMIYANA angegebenen Methode der RSV-Antigen-Präparation: verschiedene Methoden der Zellaufschließung 42

1.6. Eigene Variation der "Inkubationsmethode" zur Präparation des RSV-Antigens 43

1.7. Herstellung von RSV-Antigen nach der sog. "Kombinationsmethode" 43

2. Serologische Studien mit dem selbst hergestellten RSV-Antigen an 523 Serumproben aus dem Tübinger Raum im Hinblick auf epidemiologisch relevante Parameter 45

2.1. Antikörper-Titer gegen RS-Viren bei Männern und Frauen 46

2.2. RSV-Antikörper-Titer bei Frauen unterschiedlicher Schichtzugehörigkeit und unterschiedlicher Bevölkerungszugehörigkeit (Übersicht) 47

2.3. Altersverteilung der Antikörper-Spiegel gegen RSV unter deutschen Frauen bei Frauen von Arbeitern bzw. Arbeiterinnen und von Nicht-Arbeitern bzw. Nicht-Arbeiterinnen 50

2.4. RSV-Antikörper-Titer bei Frauen mit entsprechender Kinderzahl aber unterschiedlicher Schichtzugehörigkeit und unterschiedlicher Bevölkerungszugehörigkeit 51

2.5. Jahreszeitliche Verteilung der Antikörper-Spiegel gegen RSV bei 361 Frauen (93 Ausländerinnen, 268 deutsche Frauen) der Universitäts-Frauenklinik Tübingen von 1975 bis 1976 53

IV. Diskussion der Ergebnisse 54

1. Optimierung der Züchtung von RS-Viren 54

1.1. Optimierung des Wirtszell-Systems zur RS-Virus-Züchtung: ein Vergleich zwischen VERO- und HEP-2-Zellen 55

1.2. Optimierung der Temperatur zur RS-Virus-Züchtung 59

Seite

1.3. Optimierung des Kulturmediums zur RS-Virus-Züchtung 60
2. Morphologische Untersuchungen 61
2.1. Lichtmikroskopische Beurteilung des für RS-Viren charakteristischen cytopathischen Effektes: Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Virusinokulation 61
2.2. Darstellung der Bestandteile des infektiösen Überstandes einer mit RS-Viren infizierten HEP-2-Zellkultur im Rasterelektronenmikroskop 64
2.3. Untersuchung und Charakterisierung des RS-Virus mit dem Raster- (SEM) und Transmissions-Elektronenmikroskop (TEM) und seine ultrastrukturellen Besonderheiten 69
2.3.1. Rasterelektronenmikroskopische Darstellung des für RS-Viren charakteristischen CPE's 69
2.3.2. Darstellung der Ultrastruktur des RS-Virus mit Ultradünnschnitt-Präparaten von RS-virusinfizierten HEP-2-Zellen im Transmissionselektronenmikroskop 73
3. Optimierung der RS-Virus-Antigen-Präparation durch Anwendung verschiedener Methoden 78
3.1. Einschränkung der Aussagekraft der KBR 80
3.2. Einfluß der Zellaufschließung auf die Güte des RSV-Antigens 84
4. Epidemiologisch-serologische Besonderheiten bezüglich der Verbreitung von RS-Virus-Infektionen 85

V. Zusammenfassung 92

VI. Literaturverzeichnis 95

Lebenslauf 105

I. Einleitung

1. Allgemeine Vorstellung und Beschreibung des RS-Virus und des von ihm verursachten (altersspezifischen) Krankheitsbildes

Das RS-Virus ist während der ersten 6 Lebensmonate als ätiologisches Agens der Entstehung einer schlimmen und manchmal sogar tödlich endenden Bronchiolitis und Pneumonie sehr gefürchtet, vor allem in Entbindungsheimen, Säuglingsstationen und Kinderkliniken.
Diese Erkrankung der tieferen Luftwege im Säuglings- und Kleinkindesalter ist für ältere Kinder nicht mehr typisch, denn sowohl bei diesen wie auch bei Erwachsenen verläuft sie weniger ernsthaft, da sie hier hauptsächlich die oberen Luftwege erfaßt und einen "grippalen Infekt" verursacht, bzw. bei den letzteren oft als atypischer Schnupfen mit Halsschmerzen abläuft.
Bei alten Menschen, insbesondere solchen mit chronischen pulmonalen Erkrankungsformen (Emphysembronchitis, Cor pulmonale usw.) kann das Virus auch wiederum Erkrankungen der tieferen Atemwege mit ernsthaften Folgen verursachen.

2. Klassifizierung des RS-Virus

Das Respiratory Syncytial Virus ist ein RNS-Virus und wird wegen seiner Ähnlichkeit mit den Mumps-, Masern- und Parainfluenza-Viren der Paramyxovirus-Gruppe zugeordnet (WATERSON und HOBSON, 1962), da es ein mit einer Lipidhülle umgebenes Virion ist von 120-130 nm im Durchmesser und ein spiralförmig gewundenes Nucleocapsid-Filament von 13-18 nm im Durchmesser enthält. JAWETZ und Mitarbeiter (1976) jedoch meinen, daß das Viruspartikel aufgrund seines Durchmessers von 80-120 nm und dem seines Nucleocapsids von 11-15 nm kleiner als die übrigen Paramyxoviren sei.
Die Abwesenheit von Hämagglutinin unterscheidet das RS-Virus von anderen Paramyxoviren, denn trotz des Vorhandenseins von charakteristischen stachelförmigen Fortsätzen auf der

Partikeloberfläche besitzt das Virus keine hämagglutinierende Fähigkeit.
Das RS-Virus ist ein extrem labiles (Paramyxo-) Virus und wird neuerdings - weil es sich in den erwähnten Punkten von den anderen klassischen Paramyxoviren - gemeinsam mit dem Pneumonie-Virus (= PVM) der Mäuse unterscheidet - in die Gruppe Pneumovirus eingeordnet.
Durch Sedimentation des Virus in einer hochtourigen Ultrazentrifuge kann ein lösliches komplementbindendes Antigen vom Viruspartikel abgetrennt werden.

3. Historisches zum RS-Virus

Das Virus wurde erstmals im Jahre 1956 von Schimpansen in Gefangenschaft während einer Schnupfenepidemie durch MORRIS und Mitarbeiter entdeckt, die es CCA (chimpanzee coryzal agent) nannten.
Kurze Zeit später, im Jahre 1957, wiesen CHANOCK und Mitarbeiter dasselbe Virus in den Sekreten von 2 Kindern mit Erkrankungen der tieferen Atemwege (das eine hatte Pneumonie, das andere Croup) in Baltimore, Maryland nach. Sie gaben ihm wegen seiner typischen Syncytienbildung in damit infizierten Zellkulturen den Namen Respiratory Syncytial Virus (RS-Virus).
Seither wurde in der Literatur über viele Epidemien von Infektionen der tieferen Atemwege mit diesem Agens bei Kindern in Nordamerika (CHANOCK, 1962), Großbritannien (TOBIN, 1963), Australien (LEWIS et al., 1961), Deutschland (ADAMCZYK, 1971; SANDOW u. Mitarb., 1972 und HENIGST, 1975) und noch zahlreichen weiteren Ländern der nördlichen und südlichen Hemisphäre berichtet.
Die von KRAVETZ im Jahre 1961 durchgeführten Studien an erwachsenen Freiwilligen zeigten, daß trotz neutralisierender Antikörper in niedrigen Titern die Infektion nach intranasaler Applikation des Virus in einem hohen Prozentsatz der Personen auftrat. In mehr als der Hälfte der Erwachsenen folgte der Inokulation eine "banale Erkältung".
Da es sich bei diesem Virus um den wichtigsten bekannten Erreger von schweren Respirationstrakt-Erkrankungen des

Säuglings- und Kleinkindesalters handelt, befassen sich mehrere Forschergruppen mit der Entwicklung von Impfstoffen, worauf ich an anderer Stelle noch detaillierter eingehen werde.

4. Vorkommen und geographische Verbreitung des RS-Virus

Am häufigsten werden Kleinkinder und Säuglinge von der Infektion betroffen. Bei ihnen treten auch die häufigsten Komplikationen auf, denn die Mehrzahl der auf eine RSV-Infektion zurückzuführenden Fälle von Bronchiolitis tritt in den ersten 6 Lebensmonaten eines Individuums auf. Das Durchschnittsalter der Kinder, die wegen einer Bronchiolitis oder Pneumonie im Dezember 1973 in "The Montreal Children's Hospital" waren, betrug 7,5 Monate (BRODIE and SPENCE, 1973). Die Häufigkeitsrate feststellbarer spezifischer Antikörper innerhalb der (zumindest europäisch-amerikanischen) Population steigt dann bis zum Alter von 7-10 Jahren auf 60-70 % an. Danach steigt die Frequenz dieser Antikörper mit dem Alter, sodaß im Grunde genommen im Erwachsenenalter alle Menschen, wenn auch oft sehr niedrige und mit den herkömmlichen Mitteln und Methoden nicht immer feststellbare Antikörper-Titer gegen RS-Viren haben.

5. Das klinische Bild einer RSV-Infektion

Bei der RSV-Infektion ergeben sich 3 verschiedene, altersabhängige Manifestationsarten der Erkrankung: bei Säuglingen und Kindern sind dies Bronchiolitis, Pneumonie und fieberhafte Erkrankungen der oberen Luftwege, manchmal mit einer Otitis media als besonderer Komplikation (BERGLUND et al., 1966); bei Erwachsenen ist es gewöhnlich eine banale, afebrile Erkältung und bei den alten Menschen kommt es öfter zur Exazerbation einer Bronchitis, die manchmal von einer Pneumonie als Komplikation begleitet wird.
Bei älteren Menschen sind auch die Titer der serumneutralisierenden Antikörper geringer, weshalb diese ernsthafteren Erkrankungen der tieferen Atemwege wieder vorkommen können. (MC CLELLAND et al.1961; SOMMERVILLE, 1963 u. FRANSEN, 1967).

6. Pathogenese der RSV-Infektionskrankheit und virusbedingte, pathohistologische Veränderungen

Die Krankheit beginnt in den meisten Fällen 4-6 Tage nach der Virusinokulation. Bei den an erwachsenen Freiwilligen durchgeführten Versuchen dauerte die Inkubationszeit etwa 4 Tage, und es scheint, daß sie bei Kindern ähnlich lang ist (KNIGHT, 1973).

In vivo vermehren sich die RS-Viren in den Zellen des Naso-Pharyngeal-Traktes, sofern die Infektion die oberen Atemwege betrifft; sind die tieferen von den Viren befallen, erfolgt die Virusvermehrung im Lungengewebe in den Bronchiolarepithel- und Alveolar-Zellen, sowie in Zellen des Interstitiums.

Die RSV-Antikörper treten neben ihrem Vorkommen im Serum nach einer Infektion auch in den Sekreten der Nase und der Pharynxwand und in deren Schleimhäuten auf. Hier finden sich demnach auch histologisch nachweisbare Veränderungen (KNIGHT, 1973). Dabei sind die Hauptläsionen (akute Bronchiolitis und Bronchopneumonie) in ihrem frühen Stadium gekennzeichnet durch Nekrosen des Bronchialepithels mit geringer peribronchialer Beteiligung. In fortgeschritteneren Stadien erscheint das Bronchialepithel pleomorph mit undifferenzierten Zellen. Diese Zellen zeigen selten Einschlußkörper, was Ausdruck des regenerierenden Epithels ist (AHERNE, 1970). Sie werden in pränekrotischen Schleimhautläsionen gefunden. Später treten lymphocytäre Infiltrationen und Pfropfen von abgestoßenem Bronchialepithel auf. Die Verstopfung der Bronchiolen führt oft zum Zerfall von Lungenteilsegmenten, und es kommt zur Ausbildung eines obstruktiven Emphysems. Bei durch RS-Viren bedingter Pneumonie treten sowohl intraalveolär-exsudative Läsionen mit vorzugsweiser mononucleärer Infiltration der Alveolen auf. Ebenso findet sich eine interstitielle Pneumonie mit Ödem und hyaliner Membranbildung und lymphocytärer Infiltration des Bindegewebes.

Diese Lungenveränderungen sind in manchen Fällen nicht von Infektionen der kindlichen Lunge mit Parainfluenza- und Adeno-Viren zu unterscheiden (KNIGHT, 1973).

7. Hypothesen zur Pathogenese der durch RS-Viren bedingten Infektionskrankheit

JAWETZ und Mitarbeiter (1977) meinen, daß die klinische Erkrankung bei Kleinkindern offenbar das Resultat einer Antigen-Antikörper-Reaktion ist, die als Folge eines Zusammentreffens zwischen infektiösem Virus und diaplacentar übertragenen mütterlichen Antikörpern eintritt.
AHERNE et al. (1970) glauben, daß die im Rahmen einer RSV-Infektion auftretende Bronchiolitis ein proliferativer Prozess auf ein kleines Inokulum ist, wogegen die Pneumonie mit ihrer großen Ausdehnung die Antwort auf ein größeres Inokulum darstellt.
Dagegen vertreten GARDNER et al. (1967) bezüglich der Pathogenese einer RSV-Infektionskrankheit die Ansicht, daß die Pneumonie wohl die erste (primäre) Form der Infektion darstellt. Sie versetzt den Respirationstrakt in den Zustand einer erhöhten Reaktionsbereitschaft auf eine erneute Infektion mit demselben Virus. Die Bronchiolitis stellt ihren Angaben zufolge dann eine "allergische" Reaktion des Körpers auf die sekundäre Infektion dar.

8. Epidemiologie der RSV-Infektionskrankheit

Die Krankheit, welche sich klinisch durch das Auftreten von Symptomen wie Rhinitis, Husten, leichte Pharyngitis, Übelkeit und Kopfschmerzen (meist ohne Fieber), die ungefähr 5 Tage lang andauern, auszeichnet, ist vor allem im Winter und Frühjahr recht häufig. Dann können schwere Epidemien in stark bevölkerten Stadtteilen oder in Schulen vorkommen.
Die RSV-Epidemien treten vom späten Herbst bis zum Frühjahr auf, wobei die Spitzenmonate der Erkrankungshäufigkeit im Februar und März liegen (KIM et al., 1973). KIM et al. fanden bei ihren Untersuchungen von 13 aufeinanderfolgenden RSV-Epidemien (vom Oktober 1957 - Juni 1970) in Washington, D.C., daß das RS-Virus das einzige pathogene Virus des Atemtraktes ist, welches jedes Jahr eine größere Epidemie verursacht. Dabei wurden keine größeren jährlichen Schwankungen bezüglich der Häufigkeit und Heftigkeit der RSV-Infektionskrank-

heit unter den Kindern beobachtet. In jedem Fall ist das reinfizierte Kind oder der Erwachsene innerhalb der Familie der Hauptüberträger der Infektion für das Kleinkind.
Während des Spitzenmonats bezüglich der Infektionshäufigkeit (März) wurde bei Untersuchungen von über 15 000 Säuglingen und Kleinkindern im "Children's Hospital", Washington, D.C. während eines 11 jährigen Zeitraums das RS-Virus bei 46,2 % aller klinischen Patienten mit Bronchiolitis und bei Vorliegen einer unklaren Erkrankung der Atemwege bei 33,6 % der klinischen und 32,1 % der nicht klinischen Patienten nachgewiesen (BRANDT et al., 1973).
Es scheint auffallend, daß die RSV-Infektion in zeitlich scharf begrenzten, jährlichen Ausbrüchen (meist bei Kleinkindern) auftritt. Sie breitet sich schnell von Mensch zu Mensch aus, insbesondere unter Heimkindern und in Kinderkliniken (DITCHBURN et al., 1971). Wahrscheinlich wird sie über den Luftweg durch Tröpfcheninfektion verbreitet, aber die Übertragung infektiöser Sekrete durch Personenkontakt, insbesondere unter Kleinkindern und Kindern, kommt sehr wahrscheinlich auch vor.
In einer im Jahre 1960-1961 durchgeführten Studie stellten CHANOCK und Mitarbeiter fest, daß 57 % der Kleinkinder mit Bronchiolitis und Bronchopneumonie eine RS-Virus-Infektion durchgemacht hatten, die häufig im Zusammenhang mit einer Reinfektion stand. Die Bronchiolitis ist - obwohl sie seltener auftritt - wegen ihres schweren Verlaufs sehr eindrucksvoll und kommt fast ausschließlich im ersten Lebensjahr vor (REILLY et al., 1961). Die häufiger auftretende und oft recht ernste Bronchopneumonie tritt bevorzugt bei älteren Kindern (vor allem den 4-5 Jährigen) auf. Sie unterscheidet sich klinisch von der Bronchiolitis durch das Fehlen von Zeichen eines obstruktiven Emphysems. Die Symptome beider Krankheitsbilder überlappen sich jedoch und können bei demselben Patienten vorkommen. Sie treten jedoch nur bei einem kleinen Prozentsatz der infizierten Säuglinge und Kleinkinder auf und enden selten fatal.
Die Letalität einer RSV-Erkrankung der tieferen Atemwege bei Säuglingen und Kleinkindern ist also gering. Dennoch fand GARDNER (1967) bei der Untersuchung von 22 Todesfällen bei

Säuglingen, die innerhalb von 27 Monaten in einer Großstadt verstarben, daß 8 auf eine RSV-Infektion zurückzuführen waren.
DAVIS (1973) vom "National Institute of Allergy and Infectious Diseases" (National Institutes of Health, Bethesda, Md., USA) machte folgende Angaben: "Relativ wenige der bekannten Viren verursachen eine hohe Mortalität: Influenza, kindliche Viruspneumonie und Hepatitis sind die einzigen Viruskrankheiten, die mehr als 1 000 Tote pro Jahr verursachen".
Nach vorläufigen Schätzungen vom "Center for Disease Control" (1974) ist kindliche Viruspneumonie, insbesondere die durch das RS-Virus verursachte, für ungefähr 10 000 Todesfälle pro Jahr in den USA verantwortlich. Im Vergleich dazu ist Hepatitis B am Tode von etwa 1 000 Menschen schuld.
PARROTT und Mitarbeiter (1974) schätzen, daß in Washington, D.C. auf 1 000 Kleinkinder in der Bevölkerung jährlich 4 kommen, die wegen RSV bedingter Bronchiolitis im Krankenhaus gelegen haben.
Nach den Angaben von CHANOCK (1961), MC CLELLAND et al. (1961) und ANDREW et al. (1963) treten die Symptome einer RSV-Infektion vor allem bei Kindern auf, die jünger als 24 Monate sind. Die Mortalität an Bronchiolitis und Pneumonie ist bei Kindern unter einem Jahr verhältnismäßig größer. In diesen Fällen kann der Tod häufig ganz plötzlich eintreten, wobei flaches oder unregelmäßiges Atmen vorausgeht.

9. Diagnose der durch RS-Viren bedingten Infektionskrankheit

Sie erfolgt durch:
1. RS-Virus-Isolierung aus Abstrichen von der Rachenwand und aus Sekreten des Nasen-Rachen-Raumes.
Das Virus besitzt hohe Wirtsspezifität und vermehrt sich in menschlichen Permanentlinien wie HeLa- und HEP-2-Zellen, sowie in diploiden Zellstämmen wie WI 26- und WI 38-Zellen und Affennieren-Permanentlinien Typ VERO.
Es bewirkt in den infizierten Zellen die Bildung von syncytialen Riesenzellen, die eosinophile cytoplasmatische Einschlüsse enthalten.

Das infektiöse Virus ist etwa 10 Stunden nach Beginn der Infektion nachweisbar, und das virusspezifische Antigen läßt sich zu dieser Zeit auch im Cytoplasma finden. Der Zellkern unterliegt während der Phase der RS-Virusvermehrung keinen sichtbaren Veränderungen. Die Zugabe von RSV-Antikörpern zu Zellkulturen, die zuvor mit dem Virus inokuliert wurden, verhindert nicht die Bildung von syncytialen Riesenzellen, sodaß ein Zell-zu-Zell-Transfer von Virus in der Anwesenheit von Antiserum angenommen werden muß (KNIGHT, 1973). Dies könnte für das leichte Angehen einer Re-Infektion mit RSV bei Patienten, die am Beginn der Erkrankung im Serum und in Nasen-Rachen-Sekreten neutralisierende Antikörper besitzen, verantwortlich sein (KIM et al., 1969).
Damit die Isolierung des RS-Virus von Patienten möglich wird, ist die sofortige Inokulation der ungefrorenen Nasen-Rachen-Sekrete oder -Abstriche in den oben erwähnten Gewebekulturen erforderlich, was nach den Empfehlungen von TOBIN (1963) noch möglichst am Krankenbett erfolgen sollte. Es ist nämlich thermolabil und kann durch einen einzigen Einfrier- und Auftauvorgang inaktiviert werden. Nach den Angaben von RECHSTEINER (1969) ist diese thermische Inaktivierung bei raschem Einfrieren und der Aufbewahrung des Virusmaterials bei - 70°bis - 80°C am geringsten, und die Infektiosität des Virus bleibt weitgehend erhalten.
Im Elektronenmikroskop zeigt sich bei längerer Virusaufbewahrung bei + 4°C eine ausgeprägte Fragmentation der Viren.
Wie GRAY und Mitarbeiter (1968) und KIM und Mitarbeiter (1969) mitteilten, war in mehr als der Hälfte der Fälle mit klinisch positiver Diagnosestellung der kulturelle Virusnachweis aus Sekreten der Atemwege negativ, bei denen später aber dann durch andere diagnostische Methoden das Vorliegen einer RSV-Infektion nachgewiesen werden konnte.
Es ist allerdings möglich, daß für diese unbefriedigenden Ergebnisse bei einigen Fällen der Rachenuntersuchungen die gewonnenen Nasen- und Rachen-Sekrete einen für den Virusnachweis in der Gewebekultur zu niederen Titer enthielten, vor allem bei Kindern mit Infektionen der tieferen Atemwege.

2. Serologische Verfahren: Es ist bekannt, daß das RS-Virus ein spezifisches Oberflächen-Antigen besitzt, welches mit dem Neutralisations-Test (= NT) feststellbar ist, und ein inneres, zellgebundenes, lösliches komplementbindendes (complement-fixing) Antigen (= CF-Antigen) hat, das mittels Komplement-bindungsreaktion (= KBR) nachweisbar ist.
Obwohl kleinere Antigen-Differenzen zwischen dem RSV-Prototyp-Stamm "Long" und den in den darauffolgenden Epidemien von Atemwegserkrankungen isolierten Stämmen von COATES und Mitarbeitern (1963) und von WULFF und Mitarbeitern (1964) aufgezeigt werden konnten, scheinen die Antikörper-Reaktionen der menschlichen Seren im NT und der KBR gegen alle Virusisolierungen identisch zu sein.
Die im Rahmen der Diagnostik angewandten serologischen Testmethoden wie KBR und NT ergeben einander ähnliche Ergebnisse, obwohl der NT, entsprechend den Angaben der meisten Autoren in der Fachliteratur, empfindlicher sein soll.
Doch dies könnte - nach meinen Feststellungen aufgrund der im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Experimente und der dabei erzielten Ergebnisse, wie auch nach den Aussagen von ADAMCZYK (1971) - vom verwendeten Antigen abhängig sein. Die Wertigkeit des komplementbindenden Antigens hat nämlich maßgeblichen Einfluß auf die Empfindlichkeit der Reaktion. Bei entsprechender Optimierung der Virus-Züchtungs- und Präparations-Methode kann man eventuell ein CF-Antigen erhalten, das, wie ADAMCZYK wörtlich meint, "zu guten Ergebnissen in der KBR und zur weitgehenden Übereinstimmung mit dem NT führt" (1971).
Sowohl die KBR, und in geringerem Umfang auch der NT, können versagen bei der Aufdeckung von Fällen mit einer respiratorischen Erkrankung, wo eine positive RS-Virus-Isolierung auf der Gewebekultur vorgelegen hat. Diese Mängel zeigen die technischen Grenzen dieser serologischen Tests oder die Eigenart einer möglichen immunologischen Antwort des Menschen auf diese indirekten Virus-Nachweis-Methoden.
Der Anstieg der neutralisierenden Antikörper erfolgt meist während einer erneuten Infektion. MC LEAN fand in seinen an freiwilligen Erwachsenen durchgeführten experimentellen

Re-Infektionen mit RS-Viren einen regelmäßigen Anstieg der neutralisierenden Antikörper nur bei Individuen, die vor der Inokulation einen Antikörper-Titer unter 1:32 hatten (1973).
3. Immunfluoreszenz-Test: Während der akuten Krankheitsphase kann das RS-Virus-Antigen durch spezifische Immunfluoreszenz in cilientragenden oder polygonalen, abgeschilferten Zellen, die von Abstrichen oder dem Absaugen der Nasen- und Nasopharyngeal-Schleimhaut gewonnen wurden, bei Inokulation dieser infektiösen Sekrete in Zellkulturen, nachgewiesen werden. GARDNER und Mitarbeiter identifizierten 1970 ein solches RSV-Antigen bei 27 Patienten, die schon auf der ersten angelegten Zellkultur RS-Viren hervorbrachten. 7 Tage später zeigten 25 der 27 (≙ 93 %) immer noch die spezifische Immunfluoreszenz, obwohl sich nur 8 der 27 (≙ 26 %) in den Kulturen als positiv erwiesen.
Damit stellte sich die Immunfluoreszenz-Technik als ein schnelles Mittel zur Diagnostik einer RSV-Infektion heraus (GARDNER and MC QUILLIN, 1968).
Ebenfalls im Jahre 1970 zeigten NAGAHAMA und Mitarbeiter durch spezifische Immunfluoreszenz das RS-Virus-Antigen in Zellen des Nasopharynx bei annähernd 90 % der entweder durch Virusisolierung über die Zellkultur oder serologisch durch die KBR bereits als RSV-Träger diagnostizierten Patienten. Andere Autoren, wie GARDNER und Mitarbeiter (1968) und GRAY u. Mitarb. (1968), beschrieben mit diesem Test als Nachweismethode einer vorliegenden oder abgelaufenen Virusinfektion ähnlich günstige Ergebnisse.
NAGAHAMA u. Mitarb. (1970) meinen, daß die Zellen von der Rachenwand deshalb weniger positive Resultate ergeben, weil von der Rachenwand wahrscheinlich weniger Zellen als vom Nasopharynx gewonnen werden können.
Obwohl beim Immunfluoreszenz-Test zur Feststellung von Virus-Antigenen auch falsch positive Ergebnisse möglich sind, scheint es, im Hinblick auf die von GARDNER (1970) erzielten Ergebnisse, mit diesem möglich zu sein, aussagekräftigere Resultate zu erzielen als durch kulturelle oder serologische Methoden. Außerdem können die Ergebnisse innerhalb weniger Stunden verfügbar sein, während die Ergebnisse von Zellkul-

turen 1 bis 3 Wochen auf sich warten lassen und die serologische Untersuchung nicht vor 2 - 3 Wochen abgeschlossen werden kann, da eine zweite Serumprobe abgewartet werden muß. NELIGAN und Mitarbeiter (1970) wandten diese Methode mit Erfolg zum Nachweis des RSV an bei einer mild verlaufenden Atemwegserkrankung, die 18 Babys in einer Neugeborenen-Kinderkrippe erfaßt hatte.
Die Ergebnisse der Gewebekultur bei Anwendung des spezifischen Immunfluoreszenz-Testes an diesen Kulturen können nach 2 - 7 Tagen vorliegen, wenn auch - wie MC QUILLIN und GARDNER im Jahre 1968 feststellten - die positiven Befunde etwas geringer sind als bei der herkömmlichen Isolations- und Identifikations-Technik mittels Virusisolierung und serologischen Tests.

10. Das Problem der Impfung und Herstellung einer brauchbaren Vakzine gegen das RS-Virus

Wegen des verhältnismäßig schweren Verlaufes von Infektionen mit RS-Viren bei Kleinkindern wurden weltweite Anstrengungen zur Entwicklung eines Impfstoffes unternommen. Die ersten klinischen Versuche zur Schutzimpfung wurden mit formalininaktivierten Präparationen von konzentriertem RSV-Material durchgeführt (KIM et al., 1969). Hierbei zeigten 91 % der Geimpften einen 4-fachen oder höheren Anstieg der komplementbindenden Antikörper und 43 % nach 3 Impfdosen einen Anstieg der neutralisierenden Antikörper. Dennoch bekamen 65 % der Geimpften in den darauffolgenden Wintern eine serologisch nachweisbare Infektion mit RSV.
Darüberhinaus trat bei den Impflingen eine noch ernstere Erkrankung der Atemwege auf, als dies bei den nicht geimpften Kontrollpersonen der Fall war (KIM, 1969).
Die Tatsache der Verschlimmerung der Krankheit bei mit inaktivierter Vakzine geimpften Personen, die eine zusätzliche natürliche Infektion mit dem RS-Virus bekamen, deutet die Möglichkeit einer Veränderung der Reaktion des Wirtes an, die vermutlich auf einem ähnlichen Mechanismus wie nach Gabe von inaktiviertem Masern- (MC LEAN et al., 1970) oder Trachoma-Impfstoff (GRAYSTON et al., 1962) beruht.

Es erfolgte die Entwicklung einer kälte-adaptierten Linie (bzw. Mutante) des RSV durch FRIEDEWALD und Mitarbeiter (1968), sowie durch KIM und Mitarbeiter (1971). Diese erwies sich bei Kindern und Erwachsenen zunächst als eine harmlose, attenuierte Linie. Aber bei der Infektion von Säuglingen, die keinen vorherigen Kontakt mit RSV gehabt hatten, kam es zu einer leichten Erkrankung des Respirationstraktes.
Neuere Erkenntnisse in der Impfstoffherstellung gegen RS-Viren gewann eine amerikanische Arbeitsgruppe (WRIGHT, P.F., GHARPURE, M.A., HODES, D.S. und CHANOCK, R.M.) im Jahre 1972, wo sie genetische Studien mit 7 temperaturempfindlichen Mutanten (ts-Mutanten) des A 2-Stammes des RS-Virus durchführte. Die Isolierung und genetische Charakterisierung dieser 7 ts-Mutanten des RS-Virus erfolgten deshalb, um einen Vakzinestamm zu gewinnen, nämlich eine Mutante, die die Abwehrmechanismen des Respirationstraktes stimulieren würde, ohne sich dabei in die tieferen Atemwege auszubreiten. Eine dieser temperatursensitiven RSV-Mutanten, die sogenannte ts-1-Mutante erwies sich in vivo als genetisch stabil und es trat nach der Applikation im Nasen-Rachenraum von erwachsenen Freiwilligen keine Regression in den Wild-Typ des Virus auf. Die Vermehrung des attenuierten Virus beschränkte sich auf die oberen Atemwege der Freiwilligen und bewirkte Immunität gegenüber einer darauffolgenden Exposition gegenüber virulenten RS-Viren.
Die durch die Applikation der ts-1-Mutante bei den Patienten induzierte Resistenz gegenüber dem virulenten RSV war nicht verbunden mit dem Ansteigen der neutralisierenden Antikörper im Serum und in nasalen Sekreten. Sie bewirkte keine klinische Erkrankung und keine meßbare immunologische Antwort des Körpers. Möglicherweise hat in dieser beobachteten Resistenz die zellvermittelte Immunität eine Rolle gespielt. Vielleicht ist auch die Interferon-Bildung der gegen das Virus-Antigen sensibilisierten Lymphocyten dafür verantwortlich, denn WRIGHT et al. (1971) fanden, daß allein lokale sekretorische Antikörper der Schleimhäute (vor allem Ig A) dazu nicht ausreichen.
Als WRIGHT u. Mitarb. jedoch in den Jahren 1971 und 1973 dieses RSV-ts-1 intranasal 25 Kleinkindern im Alter von 11

bis 19 Monaten applizierten, zeigte sich - wie auch bei der Applikation des kälte-adaptierten RS-Virusstammes - bei einer kleinen Anzahl von Säuglingen, die seronegativ waren, eine extensive Virusvermehrung mit -ausscheidung und leichten Symptomen des oberen Respirationstraktes. Wegen der möglichen Beziehung zwischen diesen Symptomen und der Dosis des inokulierten Impfstoffes wurde im Jahre 1976 eine 100 mal geringere Dosis als in den vorhergehenden Versuchen (1971 und 1973) verwendet.

Die intranasale Gabe dieser Konzentration von RSV-ts-1-Impfstoff wurde von allen zu dieser Zeit völlig gesunden Impflingen gut vertragen und durch keine unmittelbaren Reaktionen begleitet. Bei Verwendung dieser Impfdosis der Vakzine blieben die oben beschriebenen Reaktionen aus, und sie reichte nicht einmal aus, um alle Impflinge zu infizieren, da nur 8 der 25 Kleinkinder (≙ 32 %) eine Infektion mit RSV-ts-1 durchmachten. Eine Beziehung zwischen Erkrankung und Impfung war nicht ersichtlich. Außerdem war eine natürliche RSV-Infektion bei den Geimpften nicht ungewöhnlich.

Damit wird deutlich, daß die RSV-ts-1-Mutante nicht der ideale Impfstoff ist. Dennoch sollten diese gefundenen ts-Mutanten weiter erforscht und als mögliches Agens einer wirksamen Vakzine weiterentwickelt werden.

II. Material und Methoden

1. Material und Zubehör:

SERVA-Pulvermedium PM 13
Trypsin
Viskin-Dialyse-Schläuche
von: Fa. SERVA Feinbiochemica, Heidelberg

Kaolin (Bolus albus)
Formalin
von: Fa. MERCK, Darmstadt

Polyäthylenglykol (Carbowax)
von: Fa. MERCK-Dr. SUCHARD, München

Fluorocarbon (Frigen 11)
von: Fa. HOECHST AG, Frankfurt

4-Kant-Flaschen
Roux-Schalen
von: Fa. BACHOFER, Reutlingen

Mikrotiter-System: Mikrotiter-Platten (U-Platten)
Diluter
Dropper mit Tropfengröße 0,05 ml und 0,025ml
von: Fa. COOKE Engineering Company, Alexandria

2. Seren:

Anti-RSV-Immunserum (Respiratory Syncytial Virus Anti-Serum for CF)
von: Fa. FLOW Laboratories, Rockville, M.D./USA

Kälberserum
von: Fa. FLOW Laboratories, Bonn

Amboceptor (Anti-Schaf-Hämolysin)
Komplement (Meerschweinchen)
von: Fa. BEHRINGWERKE AG, Marburg/Lahn

Die Zusammenstellung der untersuchten menschlichen Serumproben findet sich auf Seite 18.

3. Virusmaterial:

RSV-Test-Antigen (lyophilisiert, Wirtssystem: HEP-2-Zellen)
von: Fa. BEHRINGWERKE AG, Marburg/Lahn

RS-Virus, Prototyp-Stamm "Long"
von: Abteilung für Medizinische Virologie und Epidemiologie der Viruskrankheiten des HYGIENE-INSTITUTES der Universität Tübingen, erhalten von Dr. SCHNEEWEIS, Bonn

4. Gewebekulturzellen:

Permanentlinien von VERO-Zellen
Permanentlinien von HEP-2-Zellen
von: Abteilung für Medizinische Virologie und Epidemiologie der Viruskrankheiten des HYGIENE-INSTITUTES der Universität Tübingen

5. Medien:

Erhaltungsmedium: PM 13 + 2 % Kälberserum
Wachstumsmedium: PM 13 + 10% Kälberserum
von: eigener Herstellung

6. Apparate:

Lyophilisiergerät Wkf L 2
von: Gesellschaft für elektro-physikalischen Apparatebau, Brandau/Odenwald

Ultraschall-Gerät MSE Ultrasonic power unit (1,5-1,7 A), Type MT 20

Präparative Ultrazentrifugen Spinco L 50 und L 250 B, mit den Rotoren SW 27, SW 40 und 50
von: BECKMAN Instruments, München

Lichtmikroskop Zeiss-Invertoskop
von: Fa. Carl ZEISS, Oberkochen

Camera Zeiss CS matic 35 M

Objektiv: Achromat 10/0,22

Okular: KPL 8 x mit Cameraaufsatz

Transmissions-Elektronenmikroskope EM SIEMENS I A und ELMISKOP 102
von: Fa. SIEMENS, Berlin

Raster-Elektronenmikroskop AUTOSCAN
von: Fa. ETEC

7. Versuchstiere:

Meerschweinchen
von: Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, Tübingen

8. Pufferlösungen:

Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS, pH 7,2):
Lösung A: $NaH_2PO_4 \times H_2O$ 27,6 g/l
Lösung B: $Na_2HPO_4 \times 7\ H_2O$ 55,6 g/l

16,5 ml Lösung A + 33,5 ml Lösung B + 7,4 g NaCl
Aqua dest. ad 1 000 ml

SERVA-Pulvermedium PM 13 (Zusammensetzung):

Röhrchen A:	mg/l
NaCl	7200,00
KCl	400,00
$NaH_2PO_4 \times 2\ H_2O$	125,00
$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	200,00
$CaCl_2$ anhydr.	200,00
Glucose	4500,00
Phenolrot	16,00
Glutamin	50,00
Lactalbuminhydrolysat	5000,00
Hefeextrakt	100,00
Cholinchlorid	0,091560
Folsäure	0,000262
Nicotinsäureamid	0,007848
Pantothensäure-Calciumsalz	0,000131
Pyridoxalhydrochlorid	0,000131
Riboflavin	0,000026
Thiaminhydrochlorid	0,000196
	17891,100154

Einwaage: etwa 17,9 g pro Liter

Röhrchen B:	
$NaHCO_3$	2200,00

dunkel und trocken bei + 4° C aufbewahren. Lösung der Trockensubstanzen (von Röhrchen A und B) in 1 Liter aqua dest. aufgelöst: pH beträgt dann 7,2.
Danach Sterilfiltration des Mediums u. Lagerung bei + 4° C; event. noch Zusatz von Antibiotika.

9. Zusammensetzung des Serummaterials:

Es wurden mit der KBR insgesamt 523 Einzelseren aus dem Raum in und um Tübingen auf CF-Antikörper gegen das RS-Virus untersucht. Dieses Serummaterial setzte sich zusammen aus 361 Einzelseren von Schwangeren und Patientinnen aus der Universitäts-Frauenklinik Tübingen und aus 162 Einzelseren von ausschließlich männlichen Blutspendern der Abteilung für das Transfusionswesen der Chirurgischen Universitätsklinik Tübingen.
Die 361 Serumproben aus der Universitäts-Frauenklinik gliedern sich auf in 268 von deutschen Frauen und in 93 von Ausländerinnen, bzw. in 162 Seren von Arbeiter-Ehefrauen und Arbeiterinnen und in Serumproben von 199 Ehefrauen von Nicht-Arbeitern bzw. Nicht-Arbeiterinnen.

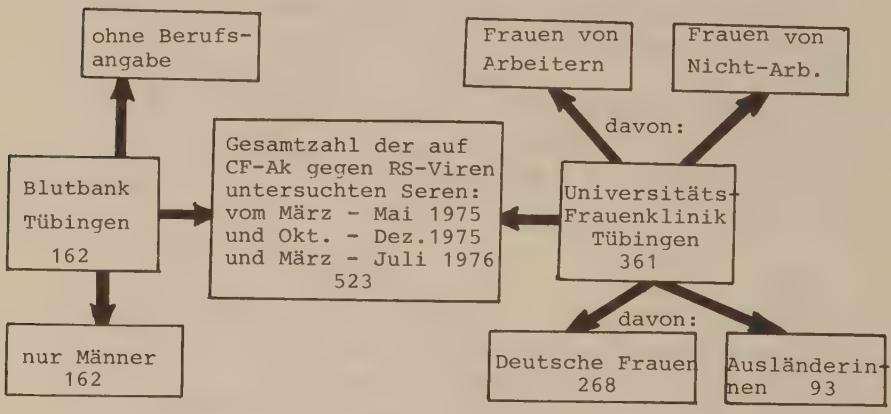


Abb. 1: Übersicht über die Zusammensetzung des Serummaterials

Die unterschiedliche Anzahl der jeweils untersuchten Seren resultiert zum einen aus der Begrenzung der Serummenge und zum anderen aus der Tatsache, daß die epidemiologisch interessanten Daten ohnehin durch die Zahl der routinemäßigen Eintragungen in die Journale begrenzt waren.
Die Serum-Proben der freiwilligen Blutspender (nur deutsche Männer) aus der Blutbank waren lediglich mit Geburtsdatum und Namen ohne sonstige ökonom.-soziale Daten, die ebenfalls

epidemiologisch interessant sind, versehen.
Nur ein geringer Teil der Seren (1-2 %) war wegen antikomplementärer Faktoren oder sonstiger technischer Unzulänglichkeiten während des Versuches nicht verwertbar.
Das Serum-Material stammt von Einsendungen aus den Zeiträumen März 1975 bis Mai 1975, Oktober bis Dezember 1975 und März 1976 bis Juli 1976, die ins Hygiene-Institut der Universität Tübingen zur routinemäßigen Untersuchung auf Lues übersandt wurden. Die Einsendungen standen ohne jegliche Beziehung zu virusbedingten Erkrankungen des Respirationstraktes.
Die verfügbaren Daten bezogen sich auf:

a.) allgemeine Daten, wie: laufende Nummer des Untersuchungsfalles, interne Nummer des Hygiene-Institutes (Virolog. Abteilung), Monat und Jahr der Blutabnahme.

b.) individuelle Daten, wie: Name, Nationalität, Geschlecht, Alter, Beruf (bzw. des Ehemannes), Anzahl der Kinder.

Die einzelnen Seren wurden nach entsprechender Kennzeichnung (mit Entnahmedatum und interner Journal-Nr.) bei -20°C gelagert.

10. Züchtung von Gewebekultur-Zellen für die RS-Virus-Vermehrung

Die verwendeten VERO-Zellen und HEP-2-Zellen konnten nach Aufbewahrung im tiefgefrorenen Zustand (- 70°C für maximal 1/2 bis 1 Jahr) wieder aufgetaut und weiterverpflanzt werden. Dazu wurde eine Vier-Kant-Flasche mit 10 ml Wachstumsmedium (PM 13 + 10 % Kälberserum) beschickt und im Brutraum bei 37°C erwärmt. Nachdem in einem kleinen Gefäß etwas Alkohol bei 37°C erwärmt war, wurden einige Ampullen (pro Vier-Kant-Flasche 2) mit den Zellen aus der Tiefkühltruhe entnommen und nach ihrem Auftauen im Alkoholbad mit der Ampullensäge eröffnet. Die Zellen wurden mit einer 5 ml Spritze entnommen und in das vorgewärmte Medium der Vier-Kant-Flasche gegeben. Es erfolgte anschließend die Zentrifugation bei 3 000 U/min für 10 min, wobei danach der Überstand de-

kantiert und die im Sediment vorhandenen Kulturzellen (VERO oder HEP-2) in eine neue Vier-Kant-Flasche mit frischem Wachstumsmedium gegeben wurden, die dann sofort wieder auf 37°C erwärmt und bei dieser Temperatur im Brutraum gelagert wurde.
Nach etwa 1 Tag wuchsen annähernd 90 % der eingefrorenen Zellen aus und bildeten einen dichten Zellrasen auf der Bodenfläche der Kulturflasche. Nach 1 Tag wurde der Überstand abgegossen und verworfen und wieder 10 ml neues Wachstumsmedium zugegeben (Mediumwechsel).
2 Tage später erfolgte bei Vorliegen eines völlig dichten Zellrasens die Umpflanzung der Zellen auf jeweils 3 neue Vier-Kant-Flaschen (Passagierung von Gewebekultur-Zellen).

11. Passagierung von Gewebekultur-Zellen

a.) Zellverpflanzung und Züchtung von VERO-Zellen:
Nach Beseitigung des Wachstumsmediums aus der Vier-Kant-Flasche bzw. Roux-Schale mit dem lichtmikroskopisch festgestellten völlig dichten VERO-Zellrasen erfolgte mit jeweils 5 ml auf etwa+35°C vorgewärmten (ansonsten bei -20°C aufbewahrten) Trypsins das 3 malige Waschen des Zellrasens, wobei pro Vier-Kant-Flasche 8 ml und pro Roux-Schale 25 ml Trypsin verwendet wurden. Dann wurde die Kulturflasche zur Ablösung der noch am Boden anhaftenden Zellen (es waren die meisten) 10 min lang bei 37°C aufbewahrt. Unter sterilen Bedingungen erfolgte nach 5 minütiger Zentrifugation der VERO-Zell-Trypsin-Suspension bei 3 000 U/min das Abpipettieren und Verwerfen des Überstandes. Zum Sediment (bestehend aus VERO-Zellen) wurden 6 ml Wachstumsmedium zugegeben, dann gut gemischt und jeweils 3 ml dieser Suspension auf eine neue Vier-Kant-Flasche verteilt, zu der noch 10 ml Wachstumsmedium hinzugefügt wurden (bei Verwendung einer Roux-Schale wurden zu dem Zellmaterial von 3 Vier-Kant-Flaschen noch 90-100 ml Wachstumsmedium zugegeben).
Es erfolgte die anschließende Aufbewahrung bei 37°C , und nach etwa 5 Tagen (bei VERO-Zellen) zeigte sich wieder ein dichter Zellrasen in der Kulturflasche, der dann genauso weiterpassagiert wurde.

b.) Zellverpflanzung und Züchtung von HEP-2-Zellen:
Dies erfolgte prinzipiell nach derselben Methode wie a.), nur daß nach dem 3 maligen Waschen des Zellrasens das Trypsin kurz vor der Ablösung des Zellrasens abgesaugt wurde. Nach Lagerung der Kulturflasche für 2-3 min im Brutraum bei 37°C ließ sich der zuvor noch fest haftende, dichte HEP-2-Zellrasen durch Beklopfen der Wand fast vollständig ablösen. Dann erfolgte die Zugabe von 6 ml Wachstumsmedium pro Vier-Kant-Flasche bzw. von 20 ml pro Roux-Schale,und nach leichtem Hin- und Herschütteln der HEP-2-Zell-Suspension wurde diese gleichmäßig auf jeweils 3 neue Vier-Kant-Flaschen bzw. das Material von 3 Vier-Kant-Flaschen auf 1 Roux-Schale übertragen, mit weiterem Wachstumsmedium beschickt und ebenfalls bei 37°C im Brutraum aufbewahrt.
Im Gegensatz zu den VERO-Zellen zeigte sich jedoch bei den HEP-2-Zellen bereits nach 2-3 Tagen in den neuen Kulturen ein dichter Zellrasen, der dann weiterpassagiert wurde.

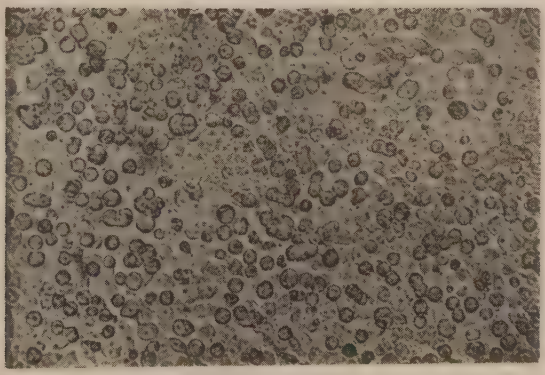


Abb. 2: 3 Tage nach der Passagierung auftretender, im Lichtmikroskop (Invertoskop) sichtbarer, dichter HEP-2-Zellrasen bei einer Vergrößerung von 120:1

12. Züchtung des RS-Virus auf Wirtszellen permanenter Zellinien (VERO- und HEP-2-Zellen)

Aus den Gewebekultur-Flaschen (Vier-Kant-Flaschen oder Roux-Schalen) mit einem völlig dichten Zellrasen wurde nach der

lichtmikroskopischen Beurteilung der Zellen das Wachstumsmedium entfernt. Es folgte das 2 malige Waschen der Gewebekulturflaschen mit jeweils 5 ml Erhaltungsmedium pro Vier-Kant-Flasche und jeweils 25 ml pro Roux-Schale. Dann wurden aus dem Überstand einer 3 Tage vorher mit RSV infizierten Zellkultur mit einem cytopathischen Effekt (CPE) von 3 + insgesamt 2 ml hochtitriges RSV-Saat-Antigen pro Vier-Kant-Flasche (VERO- und HEP-2-Zellen) bzw. 10 ml pro Roux-Schale (VERO- und HEP-2-Zellen) zugegeben.
Bei 22°C (Zimmertemperatur) erfolgte für 1 Stunde die RS-Virus-Inkubation der jeweiligen Zellkultur und anschließend die Zugabe von 10 ml Erhaltungsmedium pro Vier-Kant-Flasche und von 90 ml Erhaltungsmedium pro Roux-Schale. Dann wurden die Kulturflaschen bei 34°C, dem optimalen Temperaturbereich für die RS-Virus-Vermehrung, aufbewahrt und täglich mit dem Lichtmikroskop auf das Auftreten cytopathischer Veränderungen untersucht.

13. Lichtmikroskopie

Die lichtmikroskopische Untersuchung des für das RS-Virus charakteristischen CPE's erfolgte mit einem Invertoskop der Firma Carl Zeiss. Eine speziell angebrachte einseitig schiefe Beleuchtung diente der Erzielung eines gewissen Dunkelfeldeffektes, um die Strukturen plastischer hervorzuheben. Verwendung eines Objektivs (Achromat 10/0,22), eines Okulars (KPL 8 x) mit dem Aufsatz einer Kamera Zeiss CS matic 35 M. Der Abbildungsmaßstab betrug 60:1 im Original-Negativ.
Die exakte Vergrößerung der in dieser Arbeit dargestellten Bilder ist jeweils unter der entsprechenden Abbildung angegeben.

14. Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) und Rasterelektronenmikroskopie (SEM)

Zur Durchführung der elektronenmikroskopischen Untersuchungen der Ultrastruktur des RS-Virus sowie seines charakteristischen cytopathischen Effektes auf infizierten HEP-2-Zellen

(nach unterschiedlich langem Zeitraum seit der Inokulation) wurden diese nach Beseitigung des Mediums und sofortiger Fixierung mit 2,5 % igem Glutaraldehyd ins Max-Planck-Institut für Virusforschung, Tübingen gebracht.
Auf die genauere Beschreibung der einzelnen durchgeführten Präparationsschritte (Einbettung, Kontrastierung usw. für die TEM, bzw. Entwässern, Fixieren, Kritische Punkt-Trocknung, Sputtern usw. für die SEM) wird hier verzichtet.

15. Verschiedene Präparationsmethoden zur Gewinnung von RSV-Antigenen

Diese Verfahren werden bezüglich ihrer technischen Durchführung erst im Zusammenhang mit den dabei jeweils erzielten Ergebnissen beschrieben.

16. Komplementbindungsreaktion (KBR)

Zur Durchführung der KBR wurde die von TAKATSY entwickelte und nach SEVER modifizierte Mikromethode angewandt, die gegenüber der Makromethode den Vorteil der Einsparung von Antigen, Komplement und Zeit hat.
Es wurde das Mikrotiter-System benutzt unter Verwendung von: Droppern (1 Tropfen entspricht 0,025 ml) zum Aufbringen des Materials (KBR-Puffer, Serum, Antigen, Komplement), von Dilutern (die ein Volumen von 0,025 ml fassen) zur Durchführung der Titration in entsprechenden Verdünnungsreihen (jeweils mit Faktor 2) und von Mikrotiter-Platten (U-Platten).
Als Verdünnungsflüssigkeit wurde der von LENNETTE und SCHMIDT (1969) angegebene KBR-Puffer verwendet.
Die für den KBR-Hauptversuch notwendige Komplementkonzentration wurde im Vorversuch ermittelt bei Verwendung von Meerschweinchen-Komplement (BEHRINGWERKE AG, Marburg/Lahn), das je nach Charge 1:4,5 bis 1:12,5 verdünnt werden mußte. Damit betrug die Komplementkonzentration stets die 2-fache MHD (Minimale hämolytische Dosis). Jede Charge mußte in Abhängigkeit von dem in der KBR verwendeten RSV-Antigen ausgetestet werden, um die günstigste Konzentration zu ermitteln.

Die für die Durchführung der serologisch-immunologischen Studien notwendige Konzentration einer Antigen-Einheit wurde im Block-Versuch ermittelt.

16.1. KBR-Vorversuch zur Austestung der für den KBR-Hauptversuch benötigten Komplementkonzentration

In die Löcher einer Mikrotiter-Platte wurde jeweils 1 Tropfen (0,025 ml) Antigen und jeweils 2 Tropfen (0,05 ml) des zu testenden Meerschweinchen-Komplements in unterschiedlichen Konzentrationsverhältnissen (jeweils entsprechend einer tabellarisch angegebenen Verdünnungsreihe mit KBR-Puffer) zugegeben. Nach der Inkubation der Platte (30 min bei 33°C) erfolgte die Zugabe von jeweils 2 Tropfen des ebenfalls bei 33°C vorgewärmten hämolytischen Systems in jedes vorgetropfte Loch. Nach nochmaliger Inkubation der Platte (15 min bei 33°C) wurde diejenige Konzentration an Komplement als 1 Einheit abgelesen, die im Grenzbereich zwischen gerade gelöstem und nicht mehr löslichem Antigen-Komplement-Gemisch lag.
Im KBR-Hauptversuch wurden dabei 2 Einheiten Komplement verwendet (SCHMIDT und LENNETTE, 1969).

16.2. Inaktivierung der Seren

Aus jeder bei -20°C aufbewahrten Probe des zu untersuchenden Serummaterials wurden mit der Pipette 0,2 ml Serum entnommen und mit 0,8 ml KBR-Puffer verdünnt. Dadurch war eine Ausgangs-Serumverdünnung für die KBR-Versuche zu den serologischen Studien von 1:5 erreicht. Diese Serumverdünnung wurde mit einer Messerspitze Kaolin versehen und leicht durchgeschüttelt, dann eine halbe Stunde bei Zimmertemperatur stehen gelassen und anschließend 10 min bei 3 000 U/min zentrifugiert zur Sedimentation des Kaolins. Nun wurde der Überstand des Serums in ein neues Reagenzgläschen abgekippt und für eine halbe Stunde bei 56°C im Wasserbad zur Wärmeinaktivierung abgestellt.

16.3. Technische Durchführung der KBR auf den Mikrotiterplatten

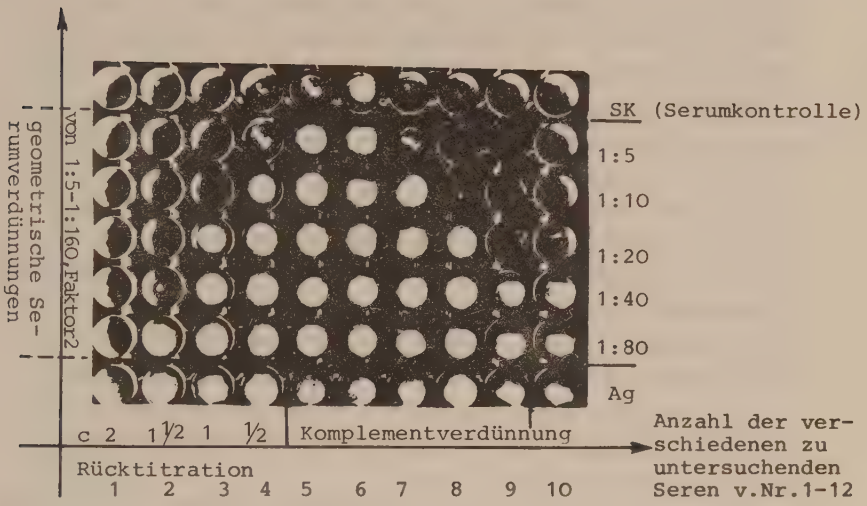


Abb.3: Foto einer Mikrotiterplatte (U-Platte) zur Durchführung der KBR

Es kann in 4 verschiedene durchzuführende Arbeitsgänge differenziert werden:

a.) Beschickung der Löcher der Mikrotiterplatte (außer denen unter der Rubrik SK = Serumkontrolle und Serumverdünnung 1:5) mit je 1 Tropfen KBR-Puffer bei Verwendung des Droppers, bei dem 1 Tropfen = 0,025 ml entspricht.
b.) Zugabe von jeweils 1 Tropfen inaktivierten Serums in die Löcher der Platte mit der Bezeichnung SK und Serumverdünnung 1:5 und 1:10. Die weitere Serumverdünnung (jeweils um den Faktor 2) erfolgt ab der Reihe Serumverdünnung 1:10 durch den Einsatz der Quirle bis zu einer Serumverdünnung von 1:160. Der Antigen-Kontrolle und den Löchern unter der Rubrik Rücktitration wird kein Serum zugefügt.

c.) Jedes Loch der Mikrotiterplatte außer das für die Serumkontrolle (SK) wird ebenfalls mit 1 Tropfen (0,025 ml) RSV-Antigen versehen.
d.) Alle Löcher außer die unter der Rubrik Rücktitration erhalten jeweils 1 Tropfen, also 2 Einheiten Komplement; dagegen die Löcher der Rücktitration unter den Reihen $1^1/2$ c, 1 c, $^1/2$ c jeweils 1 Tropfen des um den entsprechenden Faktor mit KBR-Puffer verdünnten Komplements.
Als 2 c wurde dabei die Ausgangskonzentration der im Vorversuch ermittelten Komplementverdünnung genommen.
Nach vorsichtigem Aufschütteln wird dieses Antigen-Antiserum-Komplement-Gemisch auf den einzelnen Mikrotiterplatten in den Kühlschrank (+ 4°C) gestellt, um für 16-18 Stunden zu inkubieren. Unter Hinzufügung von jeweils 2 Tropfen (≙ 0,05 ml) des hämolytischen Systems in jedes Loch der Platte kann dann das Ergebnis des KBR-Versuches abgelesen werden, sobald sich in der Komplement-Rücktitration eine Einheit Komplement gelöst hat.
Wenn in der Serumkontrolle die Hämolyse gehemmt, die SK also negativ war, wurde wegen der antikomplementären Wirkung dieses Serums das Ergebnis der Reaktion nicht gewertet. Dieser Effekt trat jedoch nur sehr selten in Erscheinung (bei etwa 1-2 % aller Seren).

16.4. Herstellung des hämolytischen Systems für die KBR

Unmittelbar vor jedem neuen Versuchsansatz mit der KBR, sowohl für den Komplement-Vorversuch als auch für den Hauptversuch, wurde dieses System hergestellt.
Es bestand aus einer 2 %igen Hammelerythrocyten-Suspension (wobei die Hammelerythrocyten vorher 3 mal in KBR-Puffer gewaschen wurden), die aus 1 ml Hammelerythrocyten und 50 ml KBR-Puffer hergestellt wurde. Dazu kam eine Hämolysin-Lösung, die sich aus einer Mischung von 0,1 ml Amboceptor (Anti-Schaf-Hämolysin) mit 49,9 ml KBR-Puffer zusammensetzte. Die vorherige Austestung ergab eine notwendige Konzentration von 1:500 des Anti-Schaf-Hämolysins in der Lösung.

Das hämolytische System wurde, nachdem es gemeinsam mit den inkubierten Mikrotiterplatten für 15 min im Brutraum bei 33°C vorgewärmt worden war, auf diese getropft (0,05 ml in jedes Loch). Anschließend erfolgte eine nochmalige Inkubation für etwa 10-15 min bei 33°C (bis zu dem Zeitpunkt, wo sich 1 Einheit Komplement in der Komplement-Rücktitration gerade gelöst hatte) und dann das Ablesen der Ergebnisse der KBR mit Hilfe des Spiegels.

17. Kontrollen

Es wurde auf jeder Mikrotiterplatte unter der Rubrik "Rücktitration" eine Komplementkontrolle mitgeführt, die angeben sollte, ob die im Vorversuch ermittelte Komplementverdünnung für den Gebrauch im KBR-Hauptversuch auch tatsächlich 2 Einheiten Komplement pro Tropfen enthielt.
In ihm selber liefen außerdem für jedes Serum eine Serumkontrolle mit.
Zusätzlich wurde zur Überprüfung der Werte eines Versuchstages bei jedem nächsten Versuchsansatz in der KBR einige Seren (etwa 8 %) vom letzten Untersuchungstag mitgeführt, die teils negative und teils positive Titerwerte bekannter Höhe hatten.

III. Ergebnisse

1. Optimierung der RSV-Antigen-Präparation durch Anwendung verschiedener Präparationsmethoden

1.1. RSV-Antigen-Präparation zur Herstellung des CF-Antigens nach der Methode von TOMIYANA (1975)

Das auf VERO-Zellen gezüchtete RS-Virus (Prototyp-Stamm "Long") wurde als hochtitriges Saatantigen in Form des Überstandes bei einem CPE von 3 + nach etwa 5-6 Tagen abgenommen und 30 Minuten bei 3 000 U/min zentrifugiert. Der durch die Dichtetrennung entstandene Überstand wurde verworfen und das dabei entstandene Sediment auf folgende Weise weiterverarbeitet:
In das sterile Zentrifugenröhrchen mit dem Sediment (bestehend aus RSV infizierten VERO-Zellen) wurde eine geringe Menge (2 ml) von PBS (phosphatgepufferter Kochsalzlösung) aufgenommen. Nach dem hintereinander erfolgenden 5 maligen Einfrieren im Wkf-L 2 Gefrier-Gerät in Alkohol und sofortigem Auftauen im Wasserbad bei + 40°C (zur thermischen Brechung der RS-virushaltigen VERO-Zellen) wurde das Material nochmals für 5 Minuten bei 3 000 U/min zentrifugiert. Diesmal wurde das Sediment verworfen und der Überstand für weitere 30 Minuten bei 5 000 g $\hat{=}$ 9 000 U/min zentrifugiert (Rotor SW 27, Beckman-Ultrazentrifuge). Das dabei entstandene Sediment wurde verworfen und der erhaltene Überstand 3 mal mit derselben Menge (jeweils 2 ml) Fluorocarbon (Frigen 11) extrahiert.
In der wässrigen Phase lag nun das komplementbindende Antigen des RS-Virus vor. Dieses wurde in der KBR-Block-Titration zur Einstellung seines Titers untersucht unter Verwendung eines Anti-RSV-Immunserums vom Meerschweinchen.

KBR-Block-Titration zur Einstellung des RSV-Antigens:

RSV-Antigenkonzentrat.	Serumverdg.				Rücktitrat.			
	10	20	40	80	2	1½	1	½
K_o	4+	4+	3+	ø	ø	ø	ø	ø
1:10	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø
1:20	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø
1:40	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø
1:80	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø
1:160	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø
SK	ø	ø	ø	ø				

Tabelle 1:

1.2. Eigene Modifikationen der Präparationsmethode von TOMIYANA zur Optimierung des RSV-Antigens

5 verschiedene Chargen von RS-Virusmaterial (4 Roux-Schalen von HEP-2-Zellen und 1 Roux-Schale von VERO-Zellen mit dichtem Zellrasen) wurde bei 34°C gezüchtet. Bei einem CPE von 3 + nach 3-4 Tagen auf den HEP-2-Zellen, die nach 2-3 Tagen einen dichten Zellrasen zeigten, und von 6 Tagen auf den VERO-Zellen, die nach 5 Tagen seit der letzten Verpflanzung einen dichten Zellrasen aufwiesen, wurde das RSV-Saat-Antigen in Form des infektiösen Überstandes von der jeweiligen Kulturflasche abgenommen. Dabei fiel auf, daß in den Kulturflaschen aller durchgeführten Passagen bei denselben Zellen (VERO- oder HEP-2-) zur selben Zeit nach der Passagierung nicht immer der Zellrasen gleich dicht war. Auch nach demselben Zeitraum seit der Inokulation mit derselben Menge des auf der gleichen Zellkultur unter identischen Bedingungen (Medium, Temperatur, Kulturflasche) gezüchteten RS-Virus zeigten nicht alle infizierten Zellkulturen immer dasselbe Ausmaß an cytopathischen Veränderungen in Form von syncytialen Riesenzellen.

Diese 5 verschiedenen Chargen von RS-Virus-Material wurden nach der von TOMIYANA (1975) angegebenen Methode unter Anwendung eigener Modifikationen zur Gewinnung eines möglichst guten RSV-Antigens präpariert.
Bei Antigen 1 wurde zwar der infektiöse Überstand für 30 Minuten bei 3 000 U/min zentrifugiert, aber der Überstand des Zentrifugates nicht verworfen, sondern als Antigen in der KBR-Block-Titration verwendet.
Antigen 2 und Antigen 3 wurden gleich präpariert (nach der Methode von TOMIYANA). Es wurden Kulturflaschen mit dichten HEP-2-Zellrasen verwendet. Die Zellen unterschieden sich jedoch in der Passagezahl. Außerdem zeigten die Ausgangszellen von Antigen 2 nach gleicher Inkubationszeit einen geringeren CPE als die Ausgangszellen von Antigen 3.
Trotz identischer Präparationsmethode imponiert der deutliche Unterschied in der komplementbindenden Aktivität zwischen RSV-Antigen 2 und 3 bei Verwendung desselben Antiserums der Firma FLOW Laboratories (Nr. G 830041) wie aus Tabelle 2 der folgenden Seite hervorgeht.
Das RSV-Antigen 4 wurde aus RS-Virus-Material (desselben RS-Virus, das zur Herstellung der Antigene 1 , 2 , 3 und 5 verwendet wurde) gewonnen, nachdem es genauso wie die Antigene 2 und 3 präpariert worden war. Jedoch war dieses RS-Virus nicht auf HEP-2-Zellen gewachsen, wie das für die Präparation der anderen RSV-Antigene verwendete. Es wurde auf einem dichten Zellrasen von VERO-Zellen gezüchtet und zur selben Zeit wie das RS-Virus-Material für die anderen Antigene als infektiöser Überstand aus der Kulturflasche abgenommen bei vergleichsweise weitaus geringeren cytopathischen Veränderungen.
Das Antigen 5 war identisch mit dem infektiösen Überstand einer RS-virushaltigen HEP-2-Zellkultur.
Lichtmikroskopisch zeigte sich bei den infizierten Kulturen zur Gewinnung der Antigene 2 und 5 ein etwa gleich starker CPE.
Als Kontrolle und Vergleichsmöglichkeit für die Qualität dieser 5 RSV-Antigene lief als Antigen 6 ein von der Firma BEHRINGWERKE AG gekauftes RSV-Antigen mit bekanntem Titer mit.

KBR-Block-Titration zur Einstellung des RSV-Antigens:

RSV-Antigen 1 : Serumverdünng. Rücktit.

RSV-Ag	5	10	20	40	80	160	2	1½	1	½
K_O	4+	4+	4+	4+	4+	4+	ø	2+	4+	4+
1:10	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	2+	4+
1:20	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	2+	4+
1:40	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	2+	4+
1:80	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	4+
1:160	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	3+
SK	ø	ø	ø	ø	ø	ø				

RSV-Antigen 2 : Serumverdünng. Rücktit.

RSV-Ag	5	10	20	40	80	160	2	1½	1	½
K_O	4+	4+	4+	4+	4+	ø	ø	ø	2+	4+
1:10	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	2+	4+
1:20	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	2+	4+
1:40	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	2+	4+
1:80	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	4+
1:160	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	4+
SK	ø	ø	ø	ø	ø	ø				

RSV-Antigen 3 : Serumverdünng. Rücktit.

RSV-Ag	5	10	20	40	80	160	2	1½	1	½
K_O	4+	4+	4+	4+	4+	2+	ø	ø	4+	4+
1:10	4+	4+	4+	4+	4+	ø	ø	ø	2+	4+
1:20	4+	4+	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	4+
1:40	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	4+
1:80	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	4+
1:160	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	4+
SK	ø	ø	ø	ø	ø	ø				

RSV-Antigen 4 : Serumverdünng. Rücktit.

RSV-Ag	5	10	20	40	80	160	2	1½	1	½
K_O	4+	4+	ø	ø	ø	ø	ø	ø	2+	4+
1:10	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	2+	4+
1:20	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	2+	4+
1:40	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	2+	4+
1:80	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	2+	4+
1:160	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	4+
SK	ø	ø	ø	ø	ø	ø				

RSV-Antigen 5 : Serumverdünng. Rücktit.

RSV-Ag	5	10	20	40	80	160	2	1½	1	½
K_O	4+	4+	4+	4+	4+	4+	ø	4+	4+	4+
1:10	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	4+	4+
1:20	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	4+	4+
1:40	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	2+	4+
1:80	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	2+	4+
1:160	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	2+	4+
SK	ø	ø	ø	ø	ø	ø				

RSV-Antigen 6 : Serumverdünng. Rücktit.

BEHRING-RSV-Ag	5	10	20	40	80	160	2	1½	1	½
	4+	4+	4+	4+	4+	ø	ø	ø	3+	4+
SK	ø	ø	ø	ø	ø	ø				

Tabelle 2:

Die Ergebnisse der mit dem Antigen 5 durchgeführten KBR-Block-Titration weichen nicht sehr von denen ab, die bei Verwendung des RSV-Antigens 2 erzielt wurden. Jedoch im Bereich der Rücktitration fällt eine stärkere Eigenhemmung des Systems auf, weil das Material (RS-Virus-HEP-2-Zell-Suspension) überhaupt nicht zentrifugiert und damit die Zelltrümmer, die ja gerade die Eigenhemmung bewirken, nicht verworfen wurden.
Alle 5, durch eigene Variation der von TOMIYANA (1975) angegebenen Präparationsmethode des RSV-Antigens gewonnenen Antigene (aus demselben RS-Virus des Institutes) sowie das als Kontrolle in der Versuchsreihe noch mitlaufende gekaufte RSV-Antigen der BEHRINGWERKE AG wurden mit demselben Immunserum und demselben Komplement getestet.

1.3. Herstellung von RSV-Antigen nach der sog. "Inkubationsmethode"

Bei einem CPE von 4 + (d.h. gerade vollständiger Ablösung der infizierten Zellen und der durch das RS-Virus gebildeten Riesenzellen auf den HEP-2-Zellkulturen) wurden diese noch für weitere 10 Tage bei 37°C im Brutraum aufbewahrt.
Der Tag des erstmaligen Auftretens eines CPE's von 4 + wurde als "Tag 0" bezeichnet. Nach diesen 10 Tagen ab dem "Tag 0" wurde der Überstand der inkubierten Wirtszellen unter sterilen Bedingungen in einen Viskin-Dialyse-Schlauch, der vorher durch Abkochen in einem siedenden Wasserbad ebenfalls weitgehendst keimfrei gemacht worden war, abgefüllt. Dieser wurde eingelegt in eine 20 %ige Carbowax-Lösung (= Polyäthylenglykol mit MG 17 000-20 000), der soviel NaCl zugesetzt worden war, daß eine 0,9 %ige Lösung vorlag. Die Aufbewahrung erfolgte bei + 4°C für 10-12 Stunden zur Einengung seines ursprünglichen Volumens von etwa 90-100 ml auf ein Zehntel, d.h. auf etwa 10 ml (durch Diffusionsvorgänge).
Es erfolgte die Zentrifugation des eingeengten Überstandes für 30 Minuten bei 20 000 U/min (Rotor SW 27, Beckman Ultrazentrifuge).
Im Gegensatz zu der RSV-Antigen-Präparationsmethode nach TOMIYANA (1975) wurde diesmal das dabei anfallende Sediment

verworfen und der noch vorhandene Überstand (etwa 8 ml) der 1. Charge bei - 70°C und der der 2. Charge bei - 20°C rasch eingefroren und aufbewahrt.
Dieser Überstand stellte das nach der "Inkubationsmethode" präparierte RSV-Antigen dar, dessen Qualität in einem vergleichenden KBR-Block-Titrations-Schema geprüft wurde. Verwendet wurde wiederum das RSV-Immunserum der Firma FLOW mit der Nr. G 830041 und das Meerschweinchen-Komplement der BEHRINGWERKE AG mit der Nr. 3103 B.
In dieser Versuchsreihe wurden insgesamt 12 Chargen von RSV-Antigen gegen das Anti-RSV-Immunserum im Vergleich zueinander ausgetestet: dabei wurden insgesamt 5 Chargen (die ersten 5, also von Nr. 1 bis Nr. 5) nach der Präparationsmethode von TOMIYANA (1975) hergestellt, welche mehr das zellgebundene, also intrazelluläre RSV-Antigen erfaßt (KNIGHT, 1973). Die nächsten 5 Chargen, also von der Nr. 6 bis Nr. 10 wurden nach der "Inkubationsmethode" gewonnen, die mehr das Oberflächen-, also extrazelluläre RSV-Antigen erfaßt (KNIGHT, 1973).
Die letzten 2 Chargen, also Nr. 11 und Nr. 12, die zwar wie alle Chargen (außer der Nr. 10) auch vor der KBR bei - 20°C eingefroren wurden, entstammen aus HEP-2-Zellen derselben Passage-Nummer wie Charge Nr. 7 bzw. Nr. 9. Hier erfolgte eine 30 minütige Ultrazentrifugation bei 20 000 U/min des in 20 %iger Carbowax-Lösung auf ein Zehntel seines Ursprungsvolumens eingeengten infektiösen Überstandes, welcher vorher ebenfalls ab einem CPE von 4 + noch 10 Tage lang bei 37°C aufbewahrt worden war. Das dabei anfallende Sediment wurde diesmal im Überstand suspendiert und als RSV-Antigen bei der KBR benutzt.
Im Gegensatz dazu wurde bei der Präparation der Chargen Nr. 6 bis Nr. 10 das Sediment verworfen.

KBR-Block-Titration zur Einstellung des RSV-Antigens:

	Ag Nr. 1 Serumverdg.					Rücktit.				Ag Nr. 2 Serumverdg.					Rücktit.				Ag Nr. 3 Serumverdg.					Rücktit.			
RSV-Ag	10	20	40	80	160	2	1½	1	½	10	20	40	80	160	2	1½	1	½	10	20	40	80	160	2	1½	1	½
K_O	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	Ø	Ø	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	2+	4+	4+	4+
1:10	4+	4+	4+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	4+	4+	4+	4+	4+	Ø	Ø	Ø	4+	4+	4+	4+	4+	2+	Ø	Ø	Ø	2+	4+
1:20	4+	2+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	4+	4+	4+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	2+	4+	4+	4+	2+	Ø	Ø	Ø	Ø	2+	4+
1:40	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	4+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	2+	4+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	2+	4+
1:80	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	2+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	2+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	4+
1:160	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	2+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	2+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	2+
SK	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø					Ø	Ø	Ø	Ø	Ø					Ø	Ø	Ø	Ø	Ø				

	Ag Nr. 4 Serumverdg.					Rücktit.				Ag Nr. 5 Serumverdg.					Rücktit.				Ag Nr. 6 Serumverdg.					Rücktit.			
RSV-Ag	10	20	40	80	160	2	1½	1	½	10	20	40	80	160	2	1½	1	½	10	20	40	80	160	2	1½	1	½
K_O	4+	4+	4+	4+	4+	Ø	2+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	2+	Ø	Ø	2+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	2+	4+	4+	4+
1:10	4+	4+	2+	Ø	Ø	Ø	Ø	4+	4+	4+	3+	2+	Ø	Ø	Ø	Ø	2+	4+	4+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	2+	4+	4+
1:20	4+	2+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	2+	4+	3+	2+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	4+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	3+	4+
1:40	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	2+	4+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	4+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	3+	4+
1:80	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	4+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	4+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	2+	4+
1:160	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	2+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	2+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	4+
SK	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø					Ø	Ø	Ø	Ø	Ø					Ø	Ø	Ø	Ø	Ø				

	Ag Nr. 7 Serumverdg.					Rücktit.				Ag Nr. 8 Serumverdg.					Rücktit.				Ag Nr. 9 Serumverdg.					Rücktit.			
RSV-Ag	10	20	40	80	160	2	1½	1	½	10	20	40	80	160	2	1½	1	½	10	20	40	80	160	2	1½	1	½
K_O	4+	4+	4+	4+	3+	Ø	2+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	2+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	2+	4+	4+	4+
1:10	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	4+	4+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	2+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	Ø	Ø	Ø	2+	4+	4+
1:20	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	2+	4+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	4+	4+	4+	3+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	2+	4+
1:40	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	2+	4+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	2+	4+	4+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	2+	4+
1:80	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	2+	4+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	4+	4+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	2+	4+
1:160	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	4+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	4+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	2+
SK	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø					Ø	Ø	Ø	Ø	Ø					Ø	Ø	Ø	Ø	Ø				

	Ag Nr.10 Serumverdg.					Rücktit.				Ag Nr.11 Serumverdg.					Rücktit.				Ag Nr.12 Serumverdg.					Rücktit.			
RSV-Ag	10	20	40	80	160	2	1½	1	½	10	20	40	80	160	2	1½	1	½	10	20	40	80	160	2	1½	1	½
K_O	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
1:10	4+	4+	4+	4+	4+	Ø	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	Ø	Ø	2+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	Ø	Ø	4+	4+
1:20	4+	4+	4+	4+	4+	Ø	Ø	Ø	4+	4+	4+	4+	Ø	Ø	Ø	Ø	2+	4+	4+	4+	4+	3+	Ø	Ø	Ø	2+	4+
1:40	4+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	4+	4+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	2+	4+	4+	2+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	4+
1:80	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	4+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	2+	4+	4+	2+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	4+
1:160	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	2+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	4+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	2+
SK	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø					Ø	Ø	Ø	Ø	Ø					Ø	Ø	Ø	Ø	Ø				

Tabelle 3:

1.4. Gewinnung von Anti-RSV-Immunserum von Meerschweinchen und Darstellung der Antikörper-Titer als Funktion der Zeit bei Verwendung zweier unterschiedlich präparierter RSV-Antigene

Insgesamt 5 gesunde Meerschweinchen wurden unter leichter Äthernarkose intranasal mit je 1 ml RS-Virus-Material, dem infektiösen Überstand einer mit RS-Viren inkubierten Roux-Schale von HEP-2-Zellen bei einem CPE von 3 + , infiziert. 20 Tage später erfolgte durch intracardiale Punktion die erste Entnahme von 5 ml Blut. Mit einem RSV-Antigen der BEHRINGWERKE AG wurde nachgewiesen, daß bereits Antikörper vorhanden waren.
Die 2. Herzpunktion und Blutabnahme (wieder jeweils 5 ml pro Tier) der inzwischen nur noch 4 Meerschweinchen (eines war nach der 1. Herzpunktion verstorben) erfolgte 6 Wochen nach der RS-Virus-Exposition der Tiere.
10 Wochen post infectionem wurde den Tieren zum dritten Mal Blut entnommen.
Unmittelbar nach jeder Entnahme wurde das Serum der Tiere gewonnen und bei - 20°C aufbewahrt bis zur vergleichenden KBR dieser insgesamt 13 Seren. Diese waren zeitlich entsprechend ihrem Entnahmedatum geordnet und wurden mit den auf zwei verschiedene Arten präparierten RSV-Antigenen in der vergleichenden KBR getestet. Es handelte sich dabei um RS-Virus-Material, das auf zelldichten HEP-2-Kulturen derselben Passage-Nummer unter identischen Bedingungen gezüchtet worden war.
Die bei dieser Versuchsreihe erhaltenen Ergebnisse sind auf den Seiten 37, 38 und 39 dargestellt (Tabelle 4).
Die daraus konstruierten Kurven des zeitlichen Verlaufes der Antikörper-Spiegel der 4 Meerschweinchen gegen die unterschiedlich präparierten zwei RSV-Antigene, eines nach der Methode von TOMIYANA (1975) und eines nach der "Inkubationsmethode", finden sich auf den Seiten 40 und 41 als Abbildung 4 und 5.

Dabei wurden die Meerschweinchen mit römischen Ziffern (I - V) und die jeweilige Anzahl der Blutentnahmen mit arabischen Ziffern (1 - 3) entsprechend ihrer zeitlichen Reihenfolge (3 Wochen, 6 Wochen und 10 Wochen post infectionem) gekennzeichnet.
Das Meerschweinchen Nr. V hatte nur die Serum-Nr. 1, weil es nach der ersten Blutentnahme bereits verstorben war, sodaß sein Serum für die Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der RSV-Antikörper-Spiegel experimentell infizierter Tiere unbrauchbar geworden war.

KBR-Block-Titration zur Feststellung des zeitlichen Verlaufs der Antikörper-Titer gegen RSV-Antigen (intranasal appliziert)

	Präparationsmethode modifiziert nach TOMIYANA (1975): vorwiegend intrazelluläres RSV-Ag											Präparationsmethode nach der "Inkubationsmethode": vorwiegend extrazelluläres RSV-Ag										
I/1	Serumverdg. Rücktit.											I/1	Serumverdg. Rücktit									
RSV-Ag	5	10	20	40	80	160	2	1½	1	½		RSV-Ag	5	10	20	40	80	160	2	1½	1	½
K_O	4+	4+	4+	4+	4+	ø	ø	ø	4+	4+		K_O	4+	4+	4+	4+	2+	ø	ø	2+	3+	4+
1:4	4+	4+	4+	ø	ø	ø	ø	ø	2+	4+		1:4	4+	4+	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	4+
1:8	4+	2+	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	2+		1:8	2+	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	2+
1:16	2+	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	2+		1:16	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	2+
1:32	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø		1:32	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø
1:64	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø		1:64	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø
SK	ø											SK	ø									
I/2	RSV-Ak-Titer 1: 70											I/2	RSV-Ak-Titer 1: 40									
RSV-Ag	5	10	20	40	80	160	2	1½	1	½		RSV-Ag	5	10	20	40	80	160	2	1½	1	½
K_O	4+	4+	4+	4+	ø	ø	ø	2+	4+	4+		K_O	4+	4+	4+	4+	ø	ø	ø	ø	2+	4+
1:4	4+	4+	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	4+		1:4	4+	4+	ø	ø	ø	ø	ø	ø	2+	3+
1:8	4+	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	2+		1:8	2+	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	2+
1:16	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	2+		1:16	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	2+
1:32	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø		1:32	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø
1:64	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø		1:64	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø
SK	ø											SK	ø									
I/3	RSV-Ak-Titer 1: 40											I/3	RSV-Ak-Titer 1: 30									
RSV-Ag	5	10	20	40	80	160	2	1½	1	½		RSV-Ag	5	10	20	40	80	160	2	1½	1	½
K_O	4+	4+	4+	4+	ø	ø	ø	2+	2+	4+		K_O	4+	4+	2+	ø	ø	ø	ø	2+	2+	4+
1:4	4+	2+	ø	ø	ø	ø	ø	ø	2+	4+		1:4	4+	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	3+
1:8	2+	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	2+		1:8	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	2+
1:16	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	2+		1:16	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	2+
1:32	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø		1:32	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø
1:64	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø		1:64	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø
SK	ø											SK	ø									
II/1	RSV-Ak-Titer 1: 30											II/1	RSV-Ak-Titer 1: 20									
RSV-Ag	5	10	20	40	80	160	2	1½	1	½		RSV-Ag	5	10	20	40	80	160	2	1½	1	½
K_O	4+	4+	4+	4+	4+	ø	ø	2+	4+	4+		K_O	4+	4+	4+	4+	4+	ø	ø	2+	4+	4+
1:4	4+	4+	4+	4+	2+	ø	ø	ø	2+	4+		1:4	4+	4+	4+	ø	ø	ø	ø	ø	2+	4+
1:8	4+	4+	2+	ø	ø	ø	ø	ø	ø	2+		1:8	4+	2+	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	2+
1:16	4+	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	2+		1:16	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	2+
1:32	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø		1:32	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø
1:64	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø		1:64	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø
SK	ø											SK	ø									
	RSV-Ak-Titer 1:100												RSV-Ak-Titer 1: 80									

Tabelle 4:

II/2	Serumverdg. Rücktit.									
RSV-Ag	5	10	20	40	80	160	2	1½	1	½
K_O	4+	4+	4+	4+	4+	Ø	Ø	2+	4+	4+
1:4	4+	4+	4+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	2+	3+
1:8	4+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	2+
1:16	2+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	2+
1:32	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
1:64	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
SK	Ø									

II/3	RSV-Ak-Titer 1: 70									
RSV-Ag	5	10	20	40	80	160	2	1½	1	½
K_O	4+	4+	4+	4+	Ø	Ø	Ø	Ø	3+	4+
1:4	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	4+
1:8	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	2+
1:16	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	2+
1:32	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
1:64	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
SK	Ø									

III/1	RSV-Ak-Titer 1: 50									
RSV-Ag	5	10	20	40	80	160	2	1½	1	½
K_O	4+	4+	4+	4+	4+	4+	Ø	2+	4+	4+
1:4	4+	4+	4+	4+	2+	Ø	Ø	Ø	2+	4+
1:8	4+	4+	3+	3+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	2+
1:16	4+	3+	3+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	2+
1:32	4+	2+	2+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
1:64	2+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
SK	Ø									

III/2	RSV-Ak-Titer 1:160									
RSV-Ag	5	10	20	40	80	160	2	1½	1	½
K_O	4+	4+	4+	4+	3+	Ø	Ø	2+	4+	4+
1:4	4+	4+	4+	2+	2+	Ø	Ø	Ø	2+	4+
1:8	4+	3+	3+	2+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	2+
1:16	4+	2+	2+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	2+
1:32	2+	2+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
1:64	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
SK	Ø									

III/3	RSV-Ak-Titer 1:100									
RSV-Ag	5	10	20	40	80	160	2	1½	1	½
K_O	4+	4+	4+	4+	Ø	Ø	Ø	2+	3+	4+
1:4	4+	4+	4+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	2+	4+
1:8	4+	3+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	2+
1:16	4+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	2+
1:32	2+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
1:64	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
SK	Ø									
	RSV-Ak-Titer 1: 70									

II/2	Serumverdg. Rücktit.									
RSV-Ag	5	10	20	40	80	160	2	1½	1	½
K_O	4+	4+	4+	4+	Ø	Ø	Ø	2+	3+	4+
1:4	4+	4+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	2+	4+
1:8	4+	2+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	2+
1:16	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	2+
1:32	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
1:64	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
SK	Ø									

II/3	RSV-Ak-Titer 1: 50									
RSV-Ag	5	10	20	40	80	160	2	1½	1	½
K_O	4+	4+	4+	4+	Ø	Ø	Ø	2+	2+	4+
1:4	4+	4+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	2+	4+
1:8	4+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	2+
1:16	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	2+
1:32	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
1:64	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
SK	Ø									

III/1	RSV-Ak-Titer 1: 40									
RSV-Ag	5	10	20	40	80	160	2	1½	1	½
K_O	4+	4+	4+	4+	4+	2+	Ø	2+	4+	4+
1:4	4+	4+	4+	4+	2+	Ø	Ø	Ø	2+	4+
1:8	4+	4+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	2+
1:16	4+	2+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	2+
1:32	2+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
1:64	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
SK	Ø									

III/2	RSV-Ak-Titer 1:110									
RSV-Ag	5	10	20	40	80	160	2	1½	1	½
K_O	4+	4+	4+	4+	2+	Ø	Ø	2+	4+	4+
1:4	4+	4+	4+	2+	Ø	Ø	Ø	Ø	2+	3+
1:8	4+	2+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	2+
1:16	2+	2+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	2+
1:32	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
1:64	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
SK	Ø									

III/3	RSV-Ak-Titer 1: 70									
RSV-Ag	5	10	20	40	80	160	2	1½	1	½
K_O	4+	4+	4+	4+	Ø	Ø	Ø	2+	4+	4+
1:4	4+	4+	2+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	2+	3+
1:8	4+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	2+
1:16	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	2+
1:32	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
1:64	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
SK	Ø									
	RSV-Ak-Titer 1: 50									

Tabelle 4: (Fortsetzung)

IV/1	Serumverdg. Rücktit								
RSV-Ag	5	10	20	40	80	160	2	1½	1	½
K_O	4+	4+	4+	4+	4+	∅	∅	2+	3+	4+
1:4	4+	4+	4+	∅	∅	∅	∅	∅	2+	3+
1:8	4+	4+	2+	∅	∅	∅	∅	∅	∅	2+
1:16	4+	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	2+
1:32	2+	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
1:64	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
SK	∅									

IV/2	RSV-Ak-Titer 1: 80								
RSV-Ag	5	10	20	40	80	160	2	1½	1	½
K_O	4+	4+	4+	4+	2+	∅	∅	2+	4+	4+
1:4	4+	4+	∅	∅	∅	∅	∅	∅	2+	4+
1:8	4+	3+	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	2+
1:16	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	2+
1:32	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
1:64	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
SK	∅									

IV/3	RSV-Ak-Titer 1: 50								
RSV-Ag	5	10	20	40	80	160	2	1½	1	½
K_O	4+	4+	4+	4+	∅	∅	∅	2+	2+	4+
1:4	4+	4+	∅	∅	∅	∅	∅	∅	2+	4+
1:8	4+	2+	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	2+
1:16	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	2+
1:32	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
1:64	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
SK	∅									

V/1	RSV-Ak-Titer 1: 40								
RSV-Ag	5	10	20	40	80	160	2	1½	1	½
K_O	4+	4+	4+	4+	3+	2+	∅	2+	2+	4+
1:4	4+	4+	4+	2+	∅	∅	∅	∅	2+	4+
1:8	4+	4+	2+	∅	∅	∅	∅	∅	∅	2+
1:16	4+	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	2+
1:32	2+	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
1:64	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
SK	∅									

	RSV-Ak-Titer 1: 80								

IV/1	Serumverdg. Rücktit								
RSV-Ag	5	10	20	40	80	160	2	1½	1	½
K_O	4+	4+	4+	4+	∅	∅	∅	2+	2+	4+
1:4	4+	4+	2+	∅	∅	∅	∅	∅	3+	4+
1:8	4+	2+	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	2+
1:16	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	2+
1:32	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
1:64	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
SK	∅									

IV/2	RSV-Ak-Titer 1: 50								
RSV-Ag	5	10	20	40	80	160	2	1½	1	½
K_O	4+	4+	4+	3+	∅	∅	∅	2+	3+	4+
1:4	4+	2+	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	3+
1:8	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	2+
1:16	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	2+
1:32	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
1:64	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
SK	∅									

IV/3	RSV-Ak-Titer 1: 30								
RSV-Ag	5	10	20	40	80	160	2	1½	1	½
Ko	4+	4+	4+	∅	∅	∅	∅	2+	3+	4+
1:4	4+	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	2+	4+
1:8	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	2+
1:16	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	2+
1:32	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
1:64	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
SK	∅									

V/1	RSV-Ak-Titer 1: 20								
RSV-Ag	5	10	20	40	80	160	2	1½	1	½
K_O	4+	4+	4+	4+	3+	∅	∅	2+	2+	4+
1:4	4+	4+	4+	∅	∅	∅	∅	∅	2+	4+
1:8	4+	4+	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	2+
1:16	4+	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	2+
1:32	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
1:64	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
SK	∅									

	RSV-Ak-Titer 1: 80								

weitere Blutabnahmen waren nicht mehr möglich, da dieses Meerschweinchen nach der 1. Blutentnahme verstorben war.

Tabelle 4: (Fortsetzung)

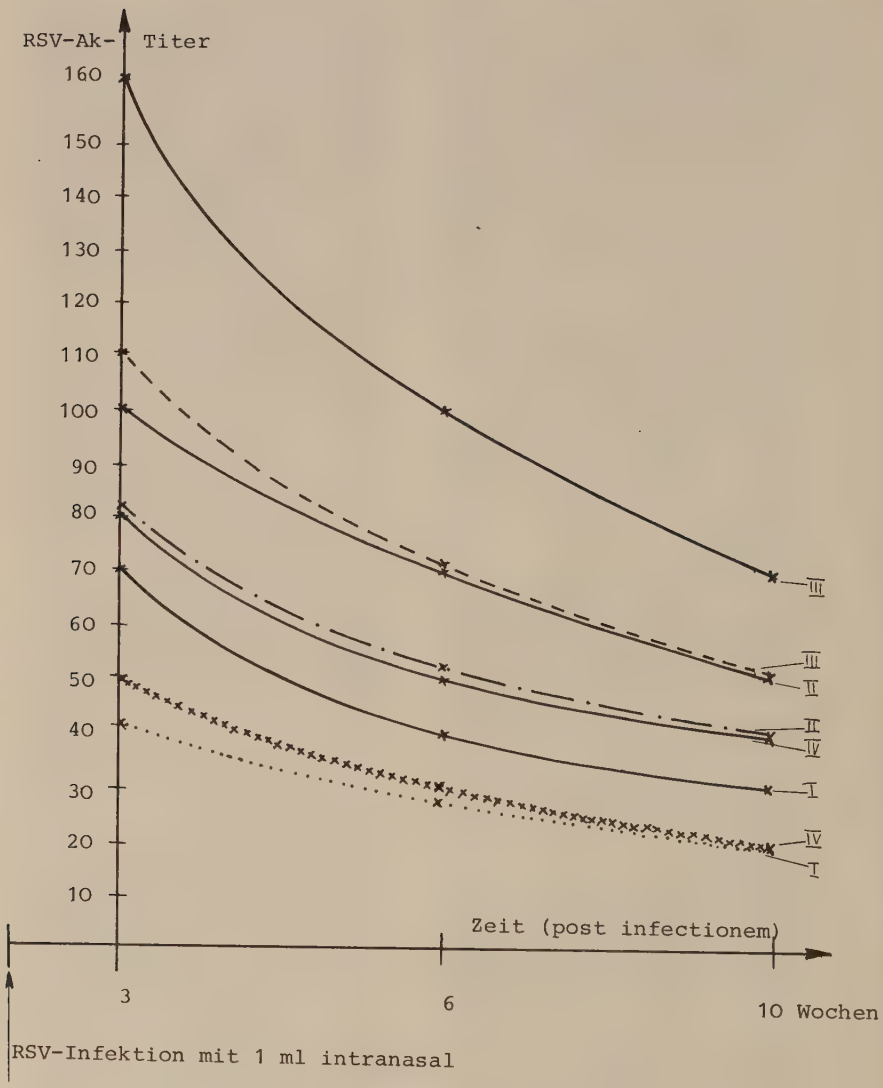


Abb. 4: Lineare graph. Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Antikörper-Spiegel gegen RSV im Serum von 4 Meerschw.

Erklärung: Durchgezogene Kurve bedeutet Verlauf des Antikörper-Spiegels bei Präparation des RSV-Antigens nach der (selbst etwas modifizierten) Methode von TOMIYANA; gestrichelte Kurve bedeutet Verlauf des Antikörper-Spiegels bei Präparation des RSV-Antigens nach der "Inkubationsmethode"

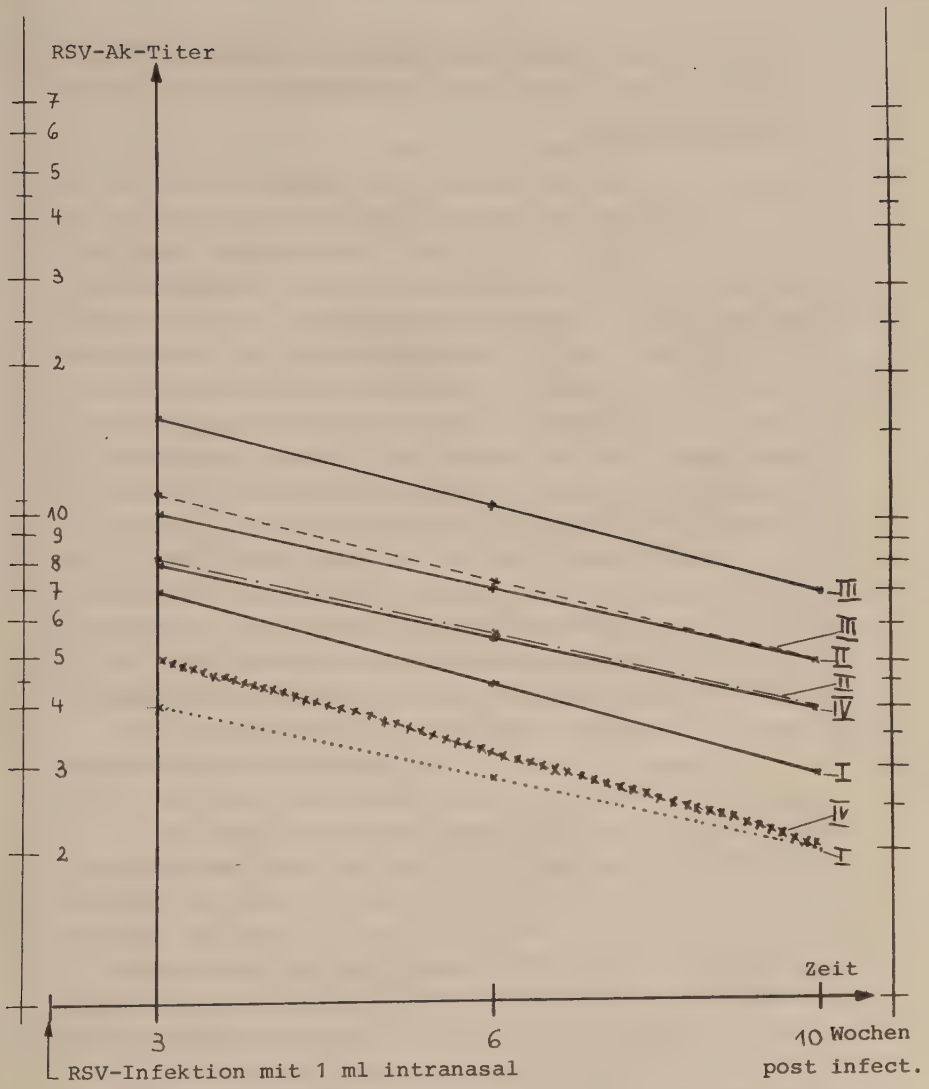


Abb. 5: Halblogarithmische graphische Darstellung des zeitlichen Verlaufes der Antikörper-Spiegel gegen RSV im Serum von 4 Meerschweinchen

Erklärung: Durchgezogene Kurve bedeutet Verlauf des Antikörper-Spiegels bei Präparation des RSV-Antigens nach der selbst modifizierten Methode von TOMIYANA; gestrichelte Kurve bedeutet Verlauf des Antikörper-Spiegels bei Präparation des RSV-Antigens nach der "Inkubationsmethode"

1.5. Weitere Variation der von TOMIYANA angegebenen Methode der RSV-Antigen-Präparation: verschiedene Methoden der Zellaufschließung

Der infektiöse Überstand einer 4 Tage vorher mit RS-Viren inokulierten HEP-2-Zellkultur in einer Roux-Schale wurde bei einem CPE von 3 + bis 4 + abgeerntet und zunächst nach der unter Punkt III.1.1. auf Seite 28 angegebenen Methode von TOMIYANA präpariert. Jedoch wurde hierbei - nun anstatt der von ihm angegebenen Methode des thermischen Aufbrechens der virusinfizierten Wirtszellen durch 5 maliges aufeinanderfolgendes Einfrieren und Auftauen des Zellsediments - dieses mechanisch durch eine 10 minütige Ultraschall-Behandlung (Ultraschallgerät: MSE ultrasonic power unit, Type MT 20) unter Eiswasserkühlung bei Verwendung von 1,6-1,7 Ampère zerschlagen. Durch das Aufreißen der Membranstrukturen dieser RS-virushaltigen HEP-2-Zellen kam es zur Freisetzung von RS-Virus-Komponenten, insbesondere des intrazellulären, zellassoziierten, komplementbindenden RSV-Antigens.
Das auf diese Weise hergestellte, weitgehend lösliche RSV-Antigen-Material wurde anschließend 90 Minuten lang bei 20 000 U/min zentrifugiert, um die enthaltenen Zelltrümmer und Membranteile durch Sedimentation vom Überstand abzutrennen, der dann als RSV-Antigen verwendet wurde.
Daneben wurden in der vergleichenden KBR noch zwei weitere, auf andere präparative Weise gewonnene Antigene des RS-Virus benutzt. Diese beiden, RSV-Antigen Nr. 4 und Nr. 5, deren Präparation in den beiden folgenden Kapiteln beschrieben wird, wurden wie der zuvor erwähnte Überstand, der dem RSV-Antigen Nr. 3 entsprach, bei - 20°C eingefroren und aufbewahrt, damit identische Präparationsbedingungen vorlagen.
Das noch verbliebene wenige Sediment, welches vor allem aus den Zelltrümmern der HEP-2-Zellen bestand (der durch die Zentrifugation entstandene Überstand ergab das RSV-Antigen Nr. 3), wurde verworfen, da es für die bei der KBR möglicherweise auftretende Eigenhemmung des Systems verantwortlich ist.

1.6. Eigene Variation der "Inkubationsmethode" zur Präparation des RSV-Antigens

Nach einem lichtmikroskopisch festgestellten CPE von 4 + wurden mehrere Chargen von 4 Tage vorher mit RS-Viren infizierten und bei 34°C gelagerten HEP-2-Zellkulturen (wie bei der "Inkubationsmethode") noch weitere 10 Tage bei 37°C im Brutraum aufbewahrt. Dies diente der Destruktion der bereits von der Unterlage abgelösten Wirtszellen durch die eintretenden autolytischen Veränderungen der Zellen bzw. durch die aggressive Wirkung des Virus selbst. Dadurch sollte erreicht werden, daß noch mehr Virusmaterial in den infektiösen Überstand gelangen konnte. Dieser wurde dann abgeerntet, unter sterilen Bedingungen in einen Viskin-Dialyse-Schlauch (jeweils einer pro Roux-Schale Material) abgefüllt und für etwa 10 Stunden in einer 20 %igen Carbowax-Lösung mit 0,9 % NaCl bei + 4°C auf etwa ein Zehntel seines ursprünglichen Volumens eingeengt. Dieses Konzentrat wurde der thermischen Brechung der noch enthaltenen, nicht zerfallenen infizierten Zellen unterzogen. Das geschah durch rasch aufeinanderfolgendes 5 maliges Einfrieren und Auftauen zur Befreiung von zellgebundenem RS-Virusmaterial.
Danach erfolgte die Zentrifugation des Materials bei 20 000 U/min für 90 Minuten in der Beckman-Ultrazentrifuge. Auch hier wurde anschließend das Sediment verworfen. Der Überstand, der mit dem komplementbindenden RSV-Antigen Nr. 4 identisch war, wurde bei - 20°C eingefroren und aufbewahrt bis zur Durchführung der vergleichenden KBR mit den auf 3 verschiedene Arten präparierten RSV-Antigenen Nr.3, Nr. 4 und Nr. 5 bei Verwendung desselben Anti-RSV-Immunserums.

1.7. Herstellung von RSV-Antigen nach der sog. "Kombinationsmethode"

Diese Methode diente zur Gewinnung des RSV-Antigens Nr. 5. Hier wurde - wie bei der "Inkubationsmethode" (III.1.3.) und der "variierten Inkubationsmethode" (III.1.6.) - der infektiöse RSV-Überstand erst nach 10 tägiger Inkubation ab einem

CPE von 4 + (bei 37°C) von 3 Roux-Schalen mit infizierten HEP-2-Zellen abgeerntet und in jeweils einem sterilen Viskin-Dialyse-Schlauch 10 Stunden lang in 20 %iger Carbowax-Lösung (plus 0,9 % NaCl) auf ungefähr ein Zehntel des Ausgangsvolumens eingeengt. Das Konzentrat wurde anschließend der thermischen Brechung durch 5 maliges rasch aufeinanderfolgendes Einfrieren und Auftauen unterzogen und dann aber noch zur optimalen Zerschlagung der verbliebenen intakten Wirtszellen zusätzlich 12 Minuten lang einer Behandlung mit Ultraschall bei Verwendung von 1,6-1,7 Ampère im "MSE ultrasonic power unit"-Gerät unter Eiswasserkühlung ausgesetzt. Damit wurde eine maximale Freisetzung von zellgebundenen RS-Virus-Komponenten mit hoher komplementbindender Aktivität (das sog. "internal soluble complement-fixing antigen" nach KNIGHT, 1973) möglich. Danach erfolgte wie bei den Präparationsmethoden des RSV-Antigens Nr. 3 u. Nr. 4 die Zentrifugation dieses Virusmaterials bei 20 000 U/min für 90 Minuten in der Ultrazentrifuge. Nach Verwerfung des aus Zelltrümmern bestehenden Sediments wurde der Überstand, der dem RSV-Antigen Nr.5 entsprach, ebenfalls bis zur Durchführung der vergleichenden KBR bei - 20°C aufbewahrt.

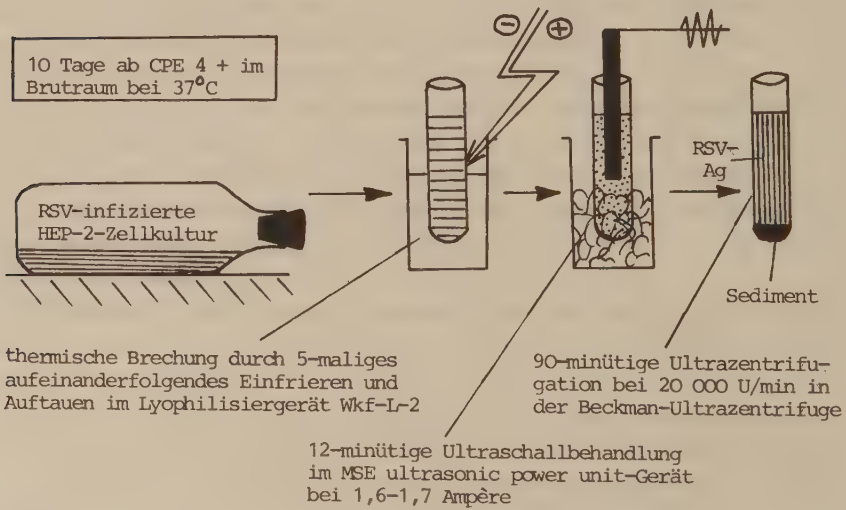


Abb. 6:

KBR-Block-Titration zur Einstellung des RSV-Antigens:

Serum: Flow-Antiserum Nr. G 830041

Komplement: Behring-Meerschweinchen-Komplement Nr. 3109 A

Antigen: RSV-Antigen nach 3 verschiedenen Methoden (unterschiedlich intensive Zellaufschließung) aus identischem Ausgangsmaterial präpariert

	RSV-Antigen Nr. 3									RSV-Antigen Nr.4									RSV-Antigen Nr.5								
	Serumverdg.					Rücktit.				Serumverdg.					Rücktit.				Serumverdg.					Rücktit.			
RSV	10	20	40	80	160	2	1½	1	½	10	20	40	80	160	2	1½	1	½	10	20	40	80	160	2	1½	1	½
K_O	4+	4+	4+	4+	2+	Ø	Ø	2+	4+	4+	4+	4+	4+	Ø	Ø	Ø	2+	4+	4+	4+	4+	4+	2+	Ø	Ø	4+	4+
1:4	4+	4+	3+	2+	Ø	Ø	Ø	Ø	4+	4+	4+	3+	Ø	Ø	Ø	Ø	2+	4+	4+	4+	4+	2+	Ø	Ø	Ø	4+	4+
1:8	4+	4+	2+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	2+	4+	2+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	2+	4+	4+	4+	Ø	Ø	Ø	Ø	2+	3+
1:16	4+	4+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	4+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	2+	4+	4+	4+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	2+
1:32	4+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	2+	4+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	2+
1:64	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	2+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
SK	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø					Ø	Ø	Ø	Ø	Ø					Ø	Ø	Ø	Ø	Ø				

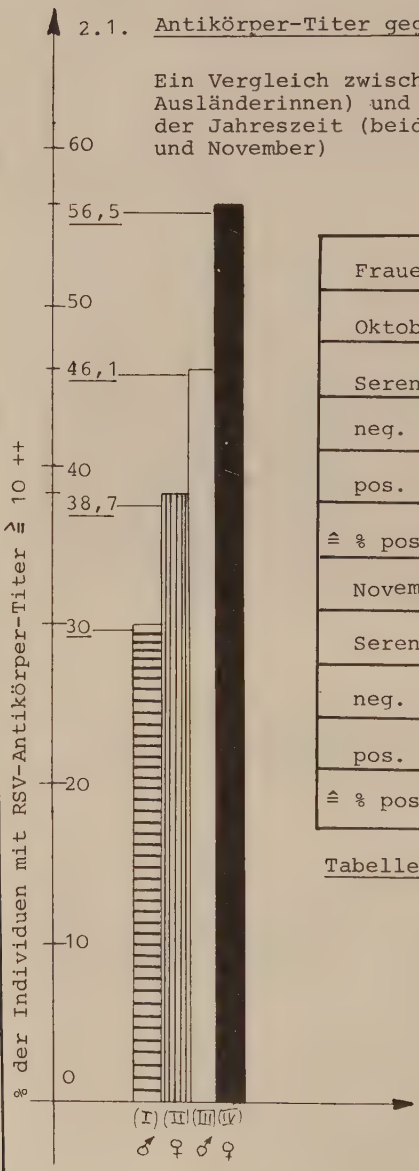
Tabelle 5:

2. Serologische Studien mit dem selbst hergestellten RSV-Antigen an 523 Serumproben aus dem Tübinger Raum im Hinblick auf epidemiologisch relevante Parameter

Mit dem nach der sog. "Kombinationsmethode" gewonnenen RSV-Antigen Nr. 5 wurden bei Verwendung einer Verdünnung von 1:2 der Ausgangskonzentration die 523 Serumproben aus der Blutbank der Chirurgischen Universitätsklinik (n=162) und der Univ. Frauenklinik Tübingen (n=361) auf das Vorhandensein komplementbindender Antikörper-Titer gegen das RS-Virus untersucht. Zur methodischen und technischen Durchführung dieser serologischen Studien siehe Angaben unter Punkt II.16.1. bis 16.4. Im Sinne einer immunologischen Durchseuchungsstudie der Bevölkerung aus dem Tübinger Raum wurden die dabei gewonnenen Ergebnisse mit verschiedenen epidemiologisch relevanten Parametern in Verbindung gebracht.

2.1. Antikörper-Titer gegen RS-Viren bei Männern und Frauen

Ein Vergleich zwischen Frauen (Deutsche und Ausländerinnen) und Männern bei entsprechender Jahreszeit (beidesmal die Monate Oktober und November)



Frauen :	Männer :
Oktober 1975	Oktober 1976
Seren 31	Seren 84
neg. Titer 19	neg. Titer 59
pos. Titer 12	pos. Titer 25
≙ % pos.Titer 38,7(II)	≙ % pos.Titer 30,0(I)
November 1975	November 1976
Seren 23	Seren 78
neg. Titer 10	neg. Titer 42
pos. Titer 13	pos. Titer 36
≙ % pos.Titer 56,5(IV)	≙ % pos.Titer 46,1(III)

Tabelle 6:

Abb. 7:

2.2. RSV-Antikörper-Titer bei Frauen unterschiedlicher Schichtzugehörigkeit und unterschiedlicher Bevölkerungszugehörigkeit (Übersicht)

I. Bevölkerungszugehörigkeit		Altersgruppe 15-20	21-25	26-30	31-35	36-40	41-45	>45 J.
Σ der untersuchten Seren	deutsche Frauen 268	28	76	85	53	20	5	1
	Ausländerinnen 93	11	30	32	9	11	-	-
	zusammen 361	39	106	117	62	31	5	1
Σ der positiven RSV-Ak-Titer	deutsche Frauen 85 ≙ 31,7%	15	29	19	15	6	1	-
	Ausländerinnen 41 ≙ 44 %	6	14	14	4	3	-	-
	zusammen 126 ≙ 34,8%	21	43	33	19	9	1	-
II. Schichtzugehörigkeit		Altersgruppe 15-20	21-25	26-30	31-35	36-40	41-45	>45 J.
Σ der untersuchten Seren	Arbeiterinnen 162	23	56	43	20	17	3	-
	Nichtarbeiterinnen 199	16	50	74	42	14	2	1
	zusammen 361	39	106	117	62	31	5	1
Σ der positiven RSV-Ak-Titer	Arbeiterinnen 71 ≙ 43,8%	13	27	19	6	6	-	-
	N.-Arbeiterinnen 55 ≙ 27,6%	8	16	14	13	3	1	-
	zusammen 126 ≙ 34,8%	21	43	33	19	9	1	-

Tabelle 7:

Altersverteilung der RSV-Antikörper-Titer bei 361 Frauen, aufgeschlüsselt in deutsche Frauen (n=268) und Ausländerinnen (n=93) sowie in Arbeiterinnen bzw. Frauen von Arbeitern (n=162) und in Nichtarbeiterinnen bzw. Frauen von Nichtarbeitern (n=199):

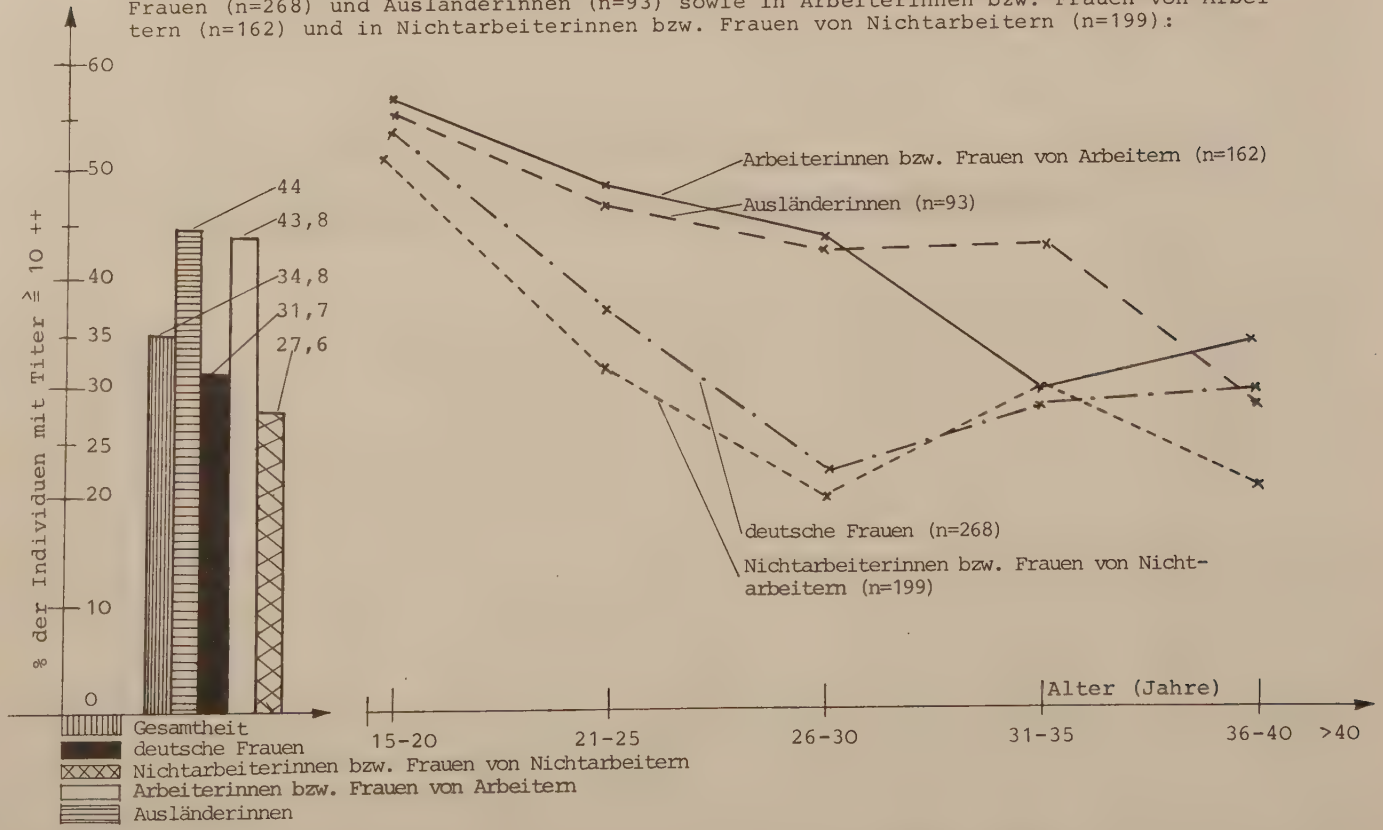


Abb. 8:

Abb. 9:

Graphische Übersicht über die sich aus den Untersuchungen mit der KBR ergebende Verteilung der Antikörper-Spiegel gegen RS-Viren bei 361 Frauen der Univ. Frauenklinik Tübingen unterschiedlicher Bevölkerungs- und unterschiedlicher Schichtzugehörigkeit:

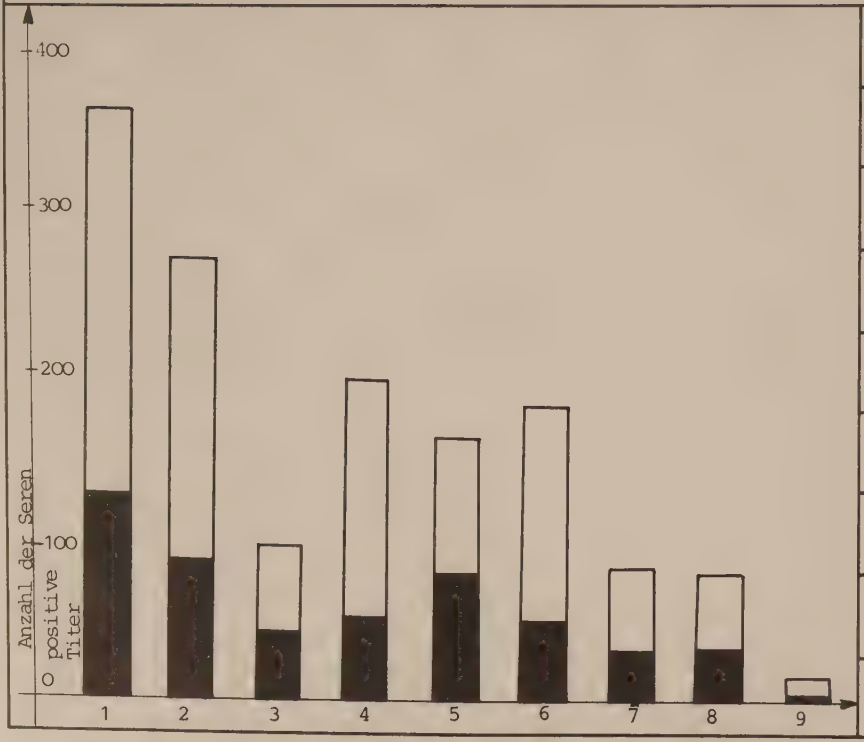


Abb. 10:

	Anzahl der Seren:	pos. Titer:
1	361 Frauen der Universitäts-Frauenklinik Tübingen	126≙34,8 %
2	268 deutsche Frauen	85≙31,7 %
3	93 Ausländerinnen	41≙44,0 %
4	199 Nichtarbeiter-Frauen (von den 361 Frauen insg.)	55≙27,6 %
5	162 Arbeiter-Frauen (von den 361 Frauen insg.)	71≙43,8 %
6	185 Nichtarbeiter-Frauen (von 268 deutsch. Frauen)	51≙27,6 %
7	83 Arbeiter-Frauen (von 268 deutsch. Frauen)	34≙40,9 %
8	79 ausländische Arbeiter-Frauen	36≙45,5 %
9	14 ausländische Nichtarbeiter-Frauen	5≙35,7 %

Tabelle 8:

2.3. Altersverteilung der Antikörper-Spiegel gegen RS-Viren unter deutschen Frauen (n=268) bei Frauen von Arbeitern (n=83) und von Nichtarbeitern (n=185)

		bzw. Arbeiterinnen			bzw. Nichtarbeiterinnen				
Altersgruppe	∑d.Seren	Arbeiter	N. Arb.	∑pos.Tit.	Arbeiter	N. Arb.	%pos.Tit	%pos.Arb	%posN.Arb
15-20	28	10	18	15	7	8	53,5	70,0	44,4
21-25	76	33	43	29	15	14	38,1	45,4	32,5
26-30	85	17	68	19	5	14	22,3	29,4	20,6
31-35	53	14	39	15	5	10	28,3	35,7	25,6
36-40	20	6	14	6	2	4	30,0	33,3	28,5
41-45	5	3	2	1	-	1	-	-	-
älter als 45	1	-	1	-	-	-	-	-	-
zusammen	268	83	185	85	34	51	31,7	40,9	27,6

Tabelle 9:

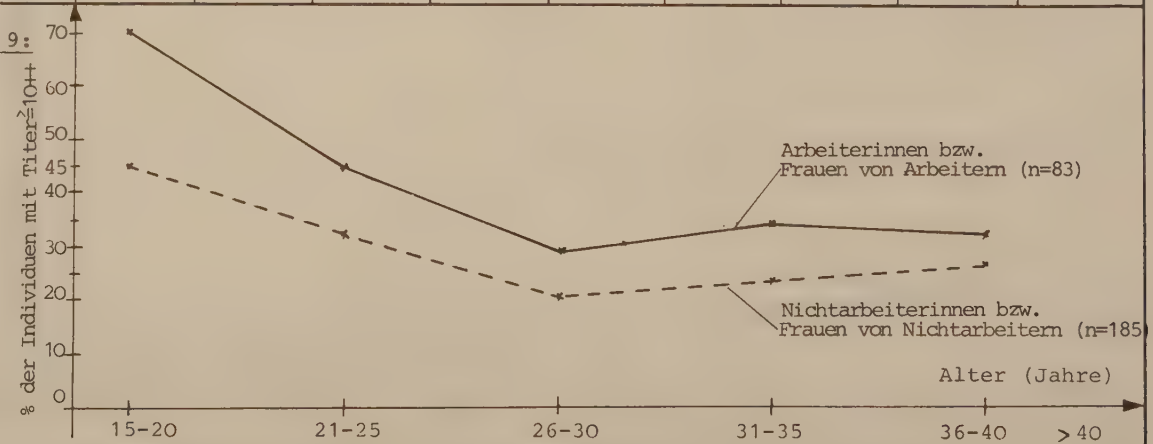


Abb. 11:

2.4. RSV-Antikörper-Titer bei Frauen mit entsprechender Kinderzahl aber unterschiedlicher Schichtzugehörigkeit und unterschiedlicher Bevölkerungszugehörigkeit

I.Bevölkerungszugehörigk.	Kinderzahl	Ø Kind	1 Kind	2 Kinder	3 Kinder	4 K.u.mehr
Σder untersuchten Seren	deutsche Frauen 268	120	82	41	16	9
	Ausländerinnen 93	22	41	18	5	7
	zusammen 361	142	123	59	21	16
Σder positiven RSV-Ak-Titer	deutsche Frauen 85 ≙ 31,7%	30	29	15	7	4
	Ausländerinnen 41 ≙ 44,0%	6	19	9	3	4
	zusammen 126 ≙ 34,8%	36	48	24	10	8

II. Schichtzugehörigkeit	Kinderzahl	Ø Kind	1 Kind	2 Kinder	3 Kinder	4 K.u.mehr
Σder untersuchten Seren	Arbeiterinnen 162	49	59	26	15	13
	Nichtarbeiterinnen 199	93	64	33	6	3
	zusammen 361	142	123	59	21	16
Σder positiven RSV-Ak-Titer	Arbeiterinnen 71 ≙ 43,8%	15	28	13	8	7
	N.-Arbeiterinnen 55 ≙ 27,6%	21	20	11	2	1
	zusammen 126 ≙ 34,8%	36	48	24	10	8

Tabelle 10:

Übersicht über die RSV-Antikörper-Spiegel bei Frauen mit jeweils entsprechender Kinderzahl, aber unterschiedlicher Schichtzugehörigkeit (162 Arbeiterinnen bzw. Frauen von Arbeitern und 199 Nichtarbeiterinnen bzw. Frauen von Nichtarbeitern) und Bevölkerungszugehörigkeit (268 deutsche Frauen und 93 Ausländerinnen):

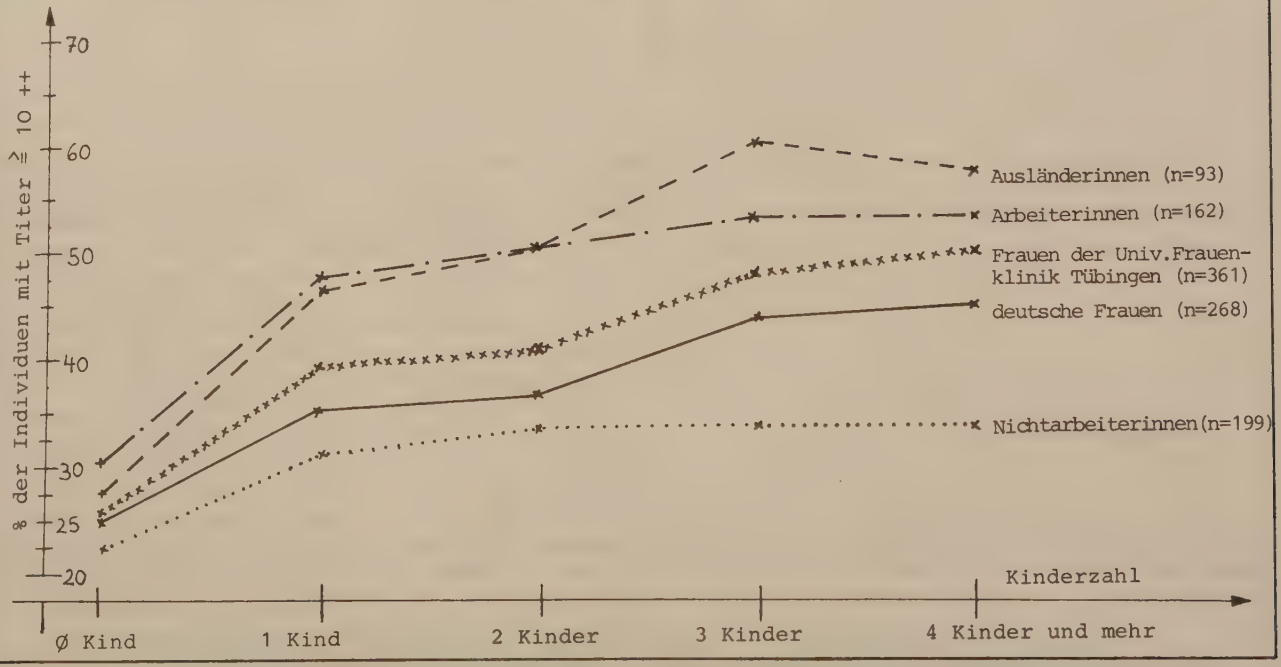


Abb. 12:

2.5. Jahreszeitliche Verteilung der Antikörper-Spiegel gegen RS-Viren bei 361 Frauen (93 Ausländerinnen, 268 deutsche Frauen) der Universitäts-Frauenklinik Tübingen von 1975-1976

Monat / Jahr		∑d. Seren	∑pos.Titer	≙ % pos.Tit.
März	1975	12	5	41,6
April	1975	16	7	43,7
Mai	1975	12	5	41,6
Oktober	1975	31	12	38,7
November	1975	23	13	56,5
Dezember	1975	39	11	28,2
März	1976	37	15	40,5
April	1976	58	21	36,2
Mai	1976	70	23	32,8
Juni	1976	28	6	21,4
Juli	1976	35	8	22,8
zusammen :		361	126	34,9

Tabelle 11:

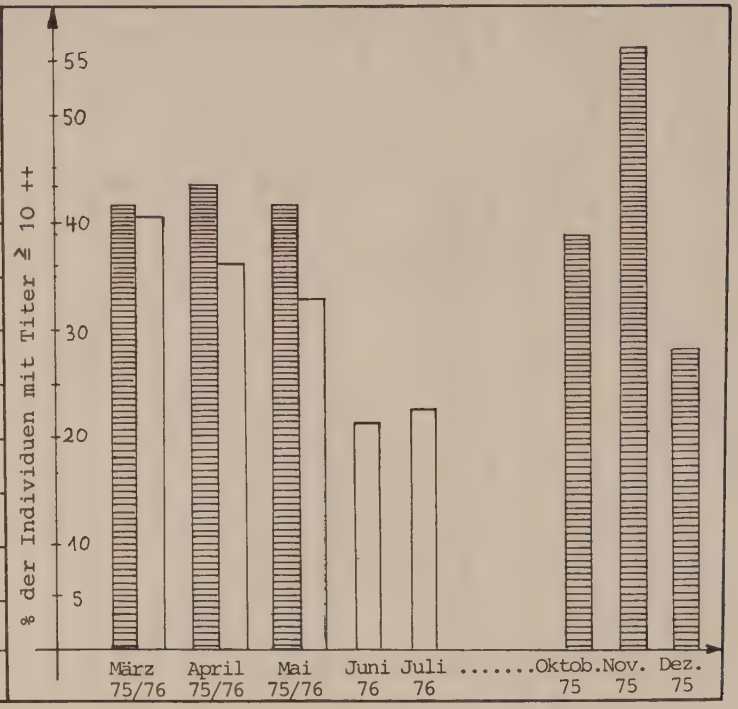


Abb. 13:

IV. Diskussion der Ergebnisse

1. Optimierung der Züchtung von RS-Viren

Die meisten Laboratorien verwenden zur RS-Virus-Isolierung zwei weitverbreitete Zellkulturen, entweder die "Bristol" HeLa-Zellen (HOLZEL et al., 1965; STOTT et al., 1967; STURDY et al., 1969; JACOBS et al., 1971) oder HEP-2-Zellen (SUTO et al., 1965; AITKIN et al., 1967; BEEM, 1969; STURDY et al., 1969).
Einige Wissenschaftler geben an, daß andere Primaten-Zellinien dafür besser geeignet seien, wie z.B. diploide menschliche Lungenzellen (ANDERSON and BEEM, 1966), kontinuierliche menschliche Amnionzellen (BERGLUND and STRAHLMANN, 1967; YOUNG and MATTHEWS, 1969; BRUNNEMANN et al., 1972) und kontinuierliche Affennieren-Zellen (BERGLUND et al., 1965).
Was das Wachstum von RS-Viren des Prototyp-Stammes "Long" in Rindernierenzellen anbelangt, liegen widersprüchliche Ergebnisse vor. Während im Jahre 1966 COATES, FORSYTH und CHANOCK von der Adaptation des RS-Virus an diese Zellen berichteten, wuchsen andere menschliche RS-Virus-Isolate auf ihnen kaum (GHARPURE et al., 1969).
Am "Royal Veterinary College" in London wurde festgestellt, daß RS-Virus-Isolate sowohl vom Menschen als auch von Rindern sehr gut auf foetalen Rinderhodenzellen (bovine testis cells = BT-Zellen) wachsen. Ein im Jahre 1973 von CAUL et al. am "Public Health Laboratory" in Bristol und von JACOBS am "Royal Veterinary College" in London durchgeführter direkter Vergleich dieser Zellen mit HeLa-Zellen ergab eine erhöhte Empfindlichkeit der BT-Zellen gegenüber den HeLa-Zellen für RS-Viren.
HEP-2-Zellen wurden für die Isolierung von RS-Viren verwendet (KAPIKIAN, 1969; BEEM, 1962). JORDAN fand in seiner 1962 erschienenen Veröffentlichung "Growth characteristics of RSV" heraus, daß die Syncytienbildung des Prototyp-Stamms "Long" des RS-Virus in HEP-2-Zellen im Vergleich zu HeLa-Zellen viel ausgeprägter und eindrucksvoller sei. STURDY und Mitarbeiter fanden 1969, daß die Isolationsraten von RS-Viren in HeLa- und HEP-2-Zellen nahezu gleich seien.

Die mangelhafte Übereinstimmung dieser Angaben mag aufzeigen, daß die Empfindlichkeit von Zellkulturen für die Isolierung von RS-Viren von der verwendeten Zellinie abhängt und davon, wie mit dieser in den verschiedenen Laboratorien umgegangen wird.
Ich wählte bei meinen Bemühungen um die Optimierung der Züchtung von RS-Viren VERO- und HEP-2-Zellen.

1.1. Optimierung des Wirtszell-Systems zur RS-Virus-Züchtung: ein Vergleich zwischen VERO- und HEP-2-Zellen

Der Prototyp-Stamm "Long" des RS-Virus wurde labormäßig sowohl auf VERO- als auch auf HEP-2-Zellen gezüchtet bei Verwendung eines jeweils völlig dichten Zellrasens und sonstiger identischer Bedingungen.
Dabei zeigte sich bei den VERO-Zellkulturen, die stets mit frischem RSV-Saat-Antigen infiziert wurden, daß die virusspezifischen cytopathischen Veränderungen erstmals nach 5-7 Tagen auftraten. Es zeigte sich dann ein deutlich ausgebildeter CPE mit 3 + , d.h. dann war lichtmikroskopisch die Bildung von für das RS-Virus charakteristischen syncytialen Riesenzellen in der infizierten Zellkultur erkennbar mitsamt der partiellen Ablösung des Zellrasens vom Glasboden der Kulturflasche.
Ein stark ausgebildeter CPE von 4 + war kaum öfters und wenn, dann erst nach 8-10 Tagen zu sehen.

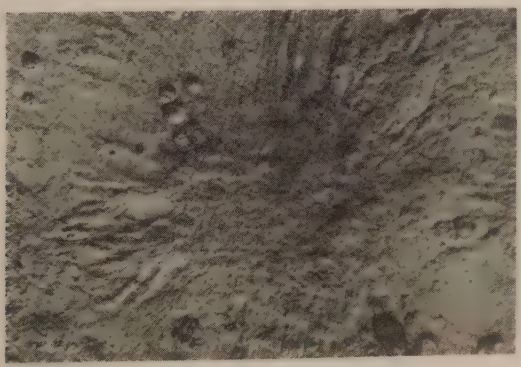


Abb.14: Bildung eines Syncytiums als typischer CPE von RS-Viren auf VERO-Zellen (5 Tage post infectionem) bei 120-facher Vergrößerung

Anders verhielt es sich mit der Ausbildung eines charakteristischen CPE bei Verwendung von HEP-2-Zellen als Wirtszell-System. Hier traten bereits schon 2 Tage nach der Virusinokulation (derselben Menge RS-Saat-Virus wie sie bei den VERO-Zellen verwendet wurde) erste lichtmikroskopisch erkennbare Veränderungen auf in Form von Zellagglomerationen und der Bildung vereinzelter größerer rundlicher Zellgebilde.

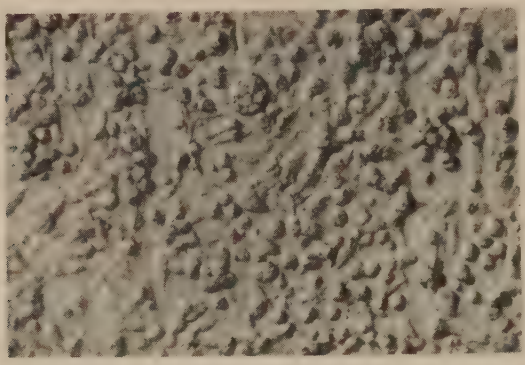


Abb.15: Erste cytopathische Veränderungen auf HEP-2-Zellen (2 Tage nach der Infektion mit RS-Viren) in Form von Zellagglomerationen und vereinzelten größeren rundlichen Zellgebilden (Vergrößerung 120:1)

Da die RS-Virus-Züchtung auf den VERO-Zellen unseres Institutes schlechter zu sein schien als auf HEP-2-Zellen (wie aus dem optisch unterschiedlich starken Ausprägungsgrad der virusspezifischen cytopathischen Veränderungen ersichtlich war) und auch das gewonnene RSV-Antigen bei Anwendung derselben Präparationstechnik (nach TOMIYANA, 1975) mit dem gleichen spezifischen Immunserum deutlich schlechtere Titer ergab als das aus infizierten HEP-2-Zellen gewonnene (siehe Ergebnisse der Tabelle 1 und 2 auf Seite 29 und 31), wurde auf die VERO-Zellen als Wirtszell-System verzichtet und zur RS-Virus-Züchtung nur noch HEP-2-Zellkulturen verwendet. Das RS-Virus gedeiht zwar sowohl auf VERO- als auch auf HEP-2-Zellen und bewirkt auch in verschiedenen anderen Zelllinien die Bildung von Syncytien, aber nur in spärlichem Ausmaß in VERO-Zellen (NORRBY et al., 1970).

Im Gegensatz zu diesen Feststellungen stehen jedoch die Aussagen von WUNNER und PRINGLE (1976). Die von ihnen verwendete BS-C-1-Linie der African green monkey kidney cells (entspricht VERO-Zellen) ist ihren Angaben zufolge empfindlicher als andere Zellen (HeLa-, HeLu-, HEP-2- und WI 38-Zellen) wegen der Klarheit und Eindeutigkeit des auf ihr unter der RS-Virus-Infektion erscheinenden cytopathischen Effektes.
Bei den von mir durchgeführten RS-Virus-Züchtungen erwiesen sich die HEP-2-Zellen als das überlegenere Zellsystem, was auch KIM, PARROTT und CHANOCK (1973) in ihrer Arbeit "Epidemiology of RSV-infection in Washington, D.C." und BERTHIAUME und Mitarbeiter (1974) in "Comparative study of RSV and PVM" bestätigen.
Wie WUNNER und PRINGLE (1976) in ihren Versuchen machte auch ich in meinen Untersuchungen die Erfahrung, daß es am günstigsten ist, wenn stets junge HEP-2-Zellkulturen (die nach 2-3 Tagen seit der letzten Passage gerade einen vollkommen dichten Zellrasen in der Kulturflasche bei 37°C erreicht haben) mit jeweils frischem RS-Virus-Material beimpft werden.
Die dauernde Infektion von stets neu passagierten Zellen ist wohl ein sehr wichtiger Faktor bei der Erreichung einer guten RS-Virus-Ausbeute. Dabei enthalten diejenigen Zellen, die sich noch nicht spontan vom ursprünglichen Zellrasen gelöst haben und sich nicht im Überstand befinden, viel zellassoziiertes RSV-Antigen von hoher komplementbindender Aktivität. Dies kommt auch in den Ergebnissen der KBR-Block-Titrationen (der Tabelle 3 auf Seite 34), wie sie mit den RSV-Antigenen Nr. 11 und Nr. 12 erzielt wurden, bei denen das Sediment mitverarbeitet wurde, zum Ausdruck. Dagegen wurde es bei den RSV-Antigenen Nr. 7 und Nr. 9 verworfen.
MC WILLIAM (1974) gibt an, daß der Virus-Titer von mit RS-Viren infizierten HEP-2-Zellkulturen in einem Beobachtungszeitraum vom 5.-48. Tag um etwa den Faktor 100 ansteigt bei lichtmikroskopisch feststellbarer Degeneration der inokulierten Zellen und unverändertem Zustand der nicht infizierten Kontrollzellen. Er beschreibt außerdem die Ausbildung einer hochgradigen Adaptation von RS-Viren, die auf HEP-2-Zellen

gezüchtet wurden, an andere Primatenzellen.
Es zeigte sich bei der Durchführung von Serienpassagen eine deutliche Abnahme des für das RS-Virus typischen CPE (sichtbar am häufigeren Auftreten von abgerundeten Zellen bei Abnahme der Bildung der ansonsten typischen Syncytien).
CAUL und Mitarbeiter (1974) vertreten die Ansicht, daß eine Steigerung der RS-Virus-Isolationsrate aus Proben bzw. eine Erhöhung des Betrags des gezüchteten RS-Virus-Materials auf die Verwendung einer Zellinie der HeLa-Zellen oder allgemein auf die Verwendung einer Zellinie mit maximaler Empfindlichkeit für diese Viren zurückzuführen sei.
Bezüglich der Wirksamkeit der RS-Virus-Züchtung auf HeLa-Zellen fand er, daß die heteroploiden HeLa-Zellen sehr rasch wuchsen und manchmal gegenüber dem RS-Virus resistente Mutanten entwickelten.
Dieses Phänomen kommt auch in der unterschiedlichen Empfindlichkeit verschiedener Zellinien der "Bristol"-HeLa-Zellen zum Ausdruck.
Auch von BALDRIDGE und SENTERFIT unter Mitwirkung von CHANOCK wurde in ihrer 1976 erschienen Veröffentlichung über "Persistent infection of cells in culture by respiratory syncytial virus" die Abnahme oder das völlige Ausbleiben der Ausbildung eines RS-virusspezifischen CPE's mit steigender Anzahl von Zellpassagen bei HEP-2-Zellen beschrieben. Sie konnten in ihren Versuchen zeigen, daß die Ausbildung eines CPE's auf HEP-2-Zellen von der Anzahl der Passagen der Zellinie abhängt, da Zellen einer niedereren Passage-Nummer einen CPE mit Bildung von syncytialen Riesenzell-Formationen zeigten, während solche einer höheren Passage diesen optischen Effekt nicht mehr aufwiesen. Die Zellen eines höheren Passagegrades sind sozusagen "heimlich" mit RS-Viren infiziert und produzieren weiterhin große Mengen von infektiösem Virus. Dieses kann diesselbe Zellinie infizieren, in ihr persistieren und sich vermehren ohne Ausbildung eines CPE's. Es stellt vorwiegend zellgebundenes RS-Virus dar und nahm nach BALDRIDGE und SENTERFIT (1976) mit steigender Passagezahl der infizierten HEP-2-Zellen zu bei gleichzeitiger deutlicher Abnahme der extrazellulären RS-Virus-Kompo-

nente und des für das Virus charakteristischen CPE's, welcher dann schließlich ganz verschwand.
Diese Befunde stimmen überein mit denen von HODES u. Mitarb. (1974), die das RS-Virus - Stamm A 2 - auf HeLa-Zellkulturen wachsen ließen und ähnliche Experimente machten.
Die Fähigkeit des RS-Virus, die Bildung von Syncytien in Zellinien zu verursachen, variiert auch nicht nur mit der verwendeten Zellinie, sondern auch mit weiteren Tochterlinien derselben Zellinie (CHANOCK, 1970).
Warum die Empfindlichkeit der Syncytienbildung bei steigender Passage-Zahl einer Zellinie oder Sub-Zellinie so rasch abnimmt, ist unklar. Trotz Resistenzentwicklung der verwendeten HEP-2-Zellen gegenüber der Entwicklung eines CPE's des RS-Virus bleibt jedoch ihre Fähigkeit zur Unterstützung der Virusvermehrung im wesentlichen erhalten (BALDRIDGE and SENTERFIT, 1976), sodaß das RS-Virus zur weiteren Infektion von HEP-2-Zellen fähig ist, ohne lichtmikroskopisch nachweisbare Ausbildung eines CPE's.
Diese Erscheinung des Nachlassens des Ausbildungsgrades der durch das RS-Virus bedingten cytopathischen Veränderungen mit steigender Passagezahl der damit infizierten HEP-2-Zellen kann auch von mir bestätigt werden. Diese Zellen wurden von mir zur RS-Virus-Züchtung über viele Passagen hinweg (insgesamt 35) verwendet. Dabei nahmen die anfangs sehr ausgeprägten typischen cytopathischen Veränderungen mit der Zeit deutlich in ihrem Ausprägungsgrad ab, was sich insbesondere am Verschwinden der charakteristischen Riesenzellen zeigte.

1.2. Optimierung der Temperatur zur RS-Virus-Züchtung

Es ist bekannt, daß RS-Viren und Proben für RS-Virus-Isolierungen (meist Rachenabstriche) sich am besten bei einer Temperatur von 34°C auf damit infizierten Zellkulturen vermehren und nicht eingefroren werden sollen (BEEM et al., 1960). Dennoch kann eine ziemlich gute Virus-Ausbeute auch dann noch erreicht werden, wenn die RS-Viren (oder Proben) sehr schnell eingefroren und bei sehr tiefen Temperaturen (ich selber verwendete - 70°C) im Erhaltungsmedium aufbewahrt werden (HAMBLING, 1964; SUTO et al., 1965; LAW and HULL, 1968).

Die Ergebnisse der vergleichenden KBR-Block-Titration mit dem RSV-Antigen Nr. 10 (Tabelle 3, Seite 34) zeigen, daß die komplementbindende Aktivität von RS-Virus-Material aus dem Überstand einer jungen Zellkultur - etwa 2-3 Tage nach der Virusinokulation entnommen - viel höher ist, als wenn es vorher eingefroren wurde. Dieses Antigen wurde nämlich im Gegensatz zu den anderen 11 Chargen nicht eingefroren, sondern direkt nach der Präparation für die KBR verwendet.
Mit zunehmender Anzahl der Einfrier- und Auftau-Vorgänge nimmt möglicherweise die komplementbindende Kapazität der RS-Viren ab, wobei ja bekannt ist, daß das RS-Virus aufgrund seiner Thermolabilität durch einen einzigen Einfrier- und Auftau-Vorgang inaktiviert werden kann (KNIGHT, 1973). Es zeigt außerdem einen deutlichen Verlust an Infektiosität bei Ultrazentrifugation (BÄCHI und HOWE, 1973).
Ähnliche Befunde in Bezug auf die RS-Virus-Isolationsrate in Abhängigkeit von der Häufigkeit der Einfrier- und Auftau-Vorgänge der Untersuchungsproben (meist aus Rachenabstrichen und nasalen Sekreten) erhoben CAUL und Mitarbeiter (1974). Sie fanden, daß bei erfolgter Inokulation dieser Proben im frischen Zustand auf HeLa-Zellen sich in etwa 70 % positive Befunde ergaben, bei nur einmaligem vorherigen Einfriervorgang aber nur noch in 43 %.
Bei Verwendung derselben Zellkultur (HeLa) berichteten CLARKE und Mitarbeiter (1964) von 27 %, HOLZEL et al. (1965) von 29 % und JACOBS et al. (1971) von 30 % positiven Befunden.

1.3. Optimierung des Kulturmediums zur RS-Virus-Züchtung

Die Zusammensetzung des verwendeten Kulturmediums (PM 13 von SERVA, Heidelberg) ist auf Seite 17 ausführlich beschrieben. Ich selber führte keine Veränderung dieser vorgegebenen Komposition des Erhaltungsmediums durch, dem lediglich noch 2 % Kälberserum zugesetzt wurden.

2. Morphologische Untersuchungen

2.1. Lichtmikroskopische Beurteilung des für RS-Viren charakteristischen cytopathischen Effektes: Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Virusinokulation

3 Tage nach der RS-Virus-Inokulation eines ursprünglich völlig dichten Zellrasens von HEP-2-Zellen zeigten sich die typischen cytopathologischen Veränderungen deutlicher.

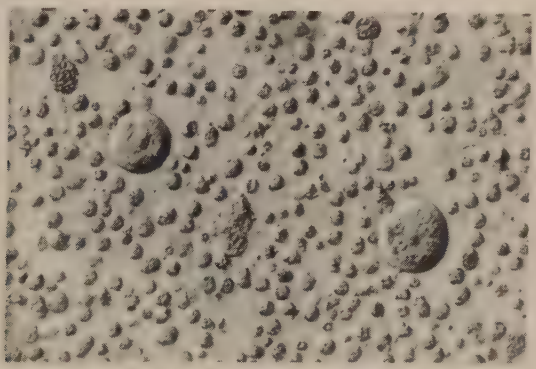


Abb.16: Auftreten typischer Riesenzellen (2) und syncytialer Zellverdichtungen (2 größere) neben kleineren rundlichen Zellen (zahlreich). Die letzteren entsprechen in ihrer Größe der von normalen, nicht infizierten HEP-2-Zellen (120-fache Vergrößerung)

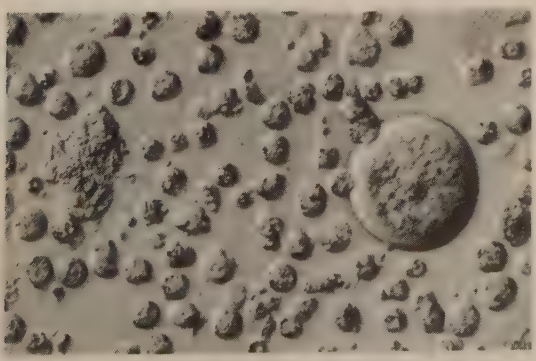


Abb.17: Vergrößertes Bild aus einem Teilbereich der Abb.16 (bei 210-facher Vergrößerung) zeigt eine für das RS-Virus typische Riesenzelle und die kleinen runden infizierten HEP-2-Zellen im Größenvergleich

Am 4. Tag nach der Virusinokulation der HEP-2-Zellkultur nahm die Zahl der auftretenden Riesenzellen weiter zu bei gleichzeitiger Abnahme der kleinen runden (infizierten oder nichtinfizierten?) HEP-2-Zellen. Diese waren wohl zum Teil in die Riesenzellen übergegangen und lösten sich - wie die Riesenzellen selber - mit zunehmender Leichtigkeit von der Kulturflaschenwand ab und entwichen in den infektiösen Überstand. Dieser Zustand an cytopathischen Veränderungen entspricht dem Ausbildungsgrad eines CPE von 3 + .

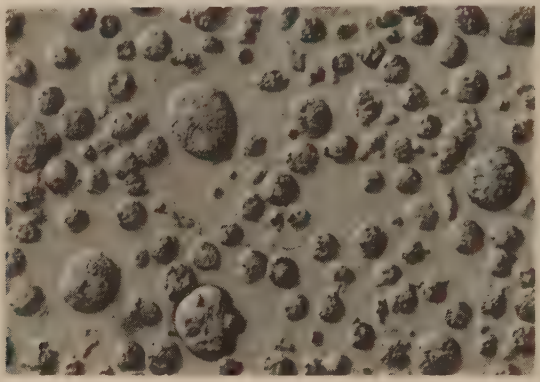


Abb.18: CPE von 3 + auf mit RS-Viren infizierten HEP-2-Zellen (bei 210-facher Vergrößerung)

Am 5. bis spätestens 7. Tag post infectionem war eine weitgehende Ablösung der mit RS-Viren infizierten HEP-2-Zellen bei noch wenigen vorhandenen Riesenzellen zu verzeichnen. Dieser Zustand entspricht einem Ausbildungsgrad des CPE von 4 +

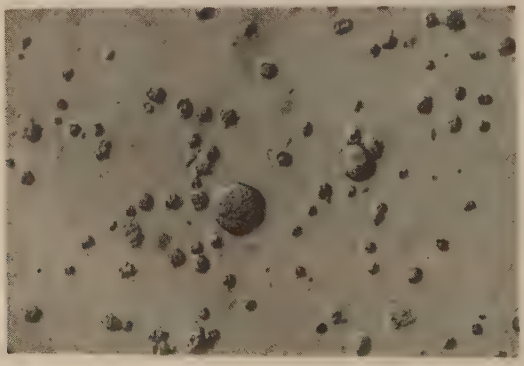


Abb.19: CPE von 4 + auf mit RSV infiz.HEP-2-Zellen (120 x Vergr.)

Mit weiterer Zunahme der Inkubationszeit der mit RS-Viren infizierten HEP-2-Zellen bei normalerweise 34°C erfolgte ab einem CPE von 4 + eine weitgehende Ablösung der kleinen rundlichen Zellen und der Riesenzellen. Die letzteren wurden dann auffallend rasch weniger und zerfielen größtenteils in größere, unregelmäßige Partikel, welche zum Teil noch auf der Unterlage der Kulturflasche hafteten oder in den infektiösen Überstand entwichen.

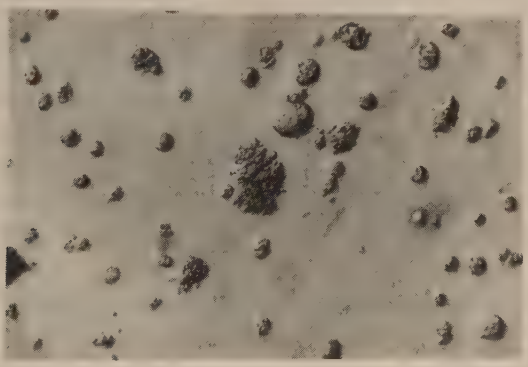


Abb.20: Mit RS-Viren infizierte HEP-2-Zellkultur im Zustand 7 Tage nach der Virusinokulation (120-fache Vergrößg.)

Dieses Verhalten dürfte entweder der optische Ausdruck einer Autolyse sein oder die mit der Zeit durch die aggressiv-destruierende Wirkung des RS-Virus selbst ausgelösten degenerativen Veränderungen an den Wirtszellen demonstrieren.
Mit der Zeit erfolgte dann eine vollkommene Ablösung aller infizierten HEP-2-Zellen (normaler Größe sowie der Riesenzellen) von der Kulturflaschenwand, und es zeigte sich ein völliges Verschwinden bzw. Zerfallen der Riesenzellen.
Ab dem 10.-12. Tag post infectionem fanden sich lichtmikroskopisch im infektiösen Überstand der "RS-Virus-HEP-2-Zell-Suspension" nur noch vereinzelte, kleine rundliche Zellen und etwas größere, unförmige zelluläre Gebilde (möglicherweise agglomerierte Zelltrümmer), die darauf hindeuten, daß das RS-Virus zunächst eine Bildung von charakteristischen Riesenzellen in infizierten Wirtszell-Systemen induziert. Möglicherweise wird dies bewirkt über eine echte Bildung von Syncytien durch die Agglomeration einzelner kleiner, infizier-

ter HEP-2-Zellen mit der Verschmelzung ihrer Membranen und den aus diesen herausragenden Proteinstrukturen von fibrillösem, fetzenartig anmutendem Charakter.
Im Vergleich dazu zeigte die Kontrolle, d.h. die nicht mit RS-Viren infizierte HEP-2-Zellkultur aus derselben Zellpassage-Nummer wie die infizierten Kulturzellen nach derselben Zeit, also 10 Tage nach der Zellverpflanzung, keine derartigen Veränderungen. Es hatten sich zwar auch hier einige Zellen vom Zellrasen abgelöst, da sie inzwischen abgestorben waren, und waren in den Überstand abgegangen, aber der Zellrasen war noch weitgehend erhalten.
Der Überstand der infizierten Kulturflasche dagegen erscheint als eine recht trübe, wolkige Masse, die zahlreiche Zelltrümmer, tote Zellen, Zellmembran-Fetzen und wohl auch freie RS-Viruspartikel enthält, wie die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen dieses infektiösen Materials enthüllen.

2.2. Darstellung der Bestandteile des infektiösen Überstandes einer mit RS-Viren infizierten HEP-2-Zellkultur im Rasterelektronenmikroskop

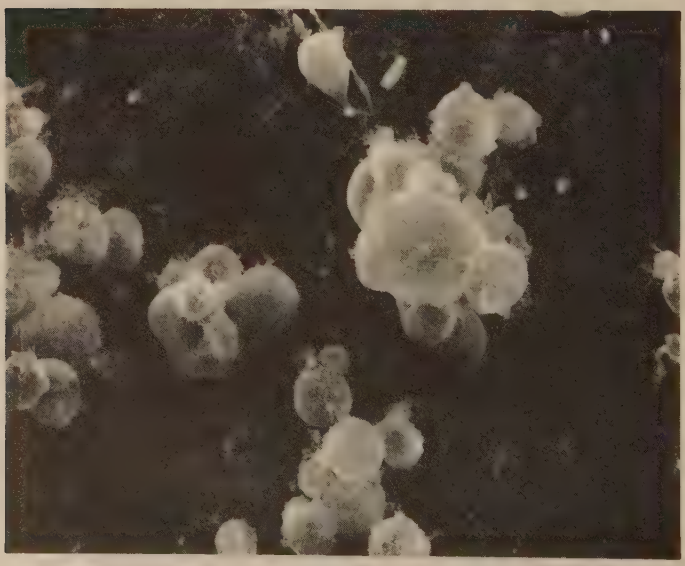


Abb.21: Übersichtsbild des infektiösen Überstandes einer 8 Tage lang mit RS-Viren infizierten HEP-2-Zellkultur im Rasterelektronenmikroskop (400 x Vergrößerung)

Das Material wurde aus dem Überstand einer mit RS-Viren infizierten HEP-2-Zellkultur, die 10 Tage alt und seit 8 Tagen in einer Vier-Kant-Flasche damit beimpft worden war, entnommen, sofort mit Glutaraldehyd (2,5 %) fixiert und präpariert.
Das vorherige Bild zeigt degenerierte, durch die RS-Virus-Wirkung teilweise zerstörte Wirtszellen,ein größeres Zellagglomerat und Membranfetzen.
Im nächsten Bild erfolgt die Darstellung des durch das RS-Virus an einer HEP-2-Zelle bedingten "budding"-Prozesses an ihrer Plasma-Membran(dem Ort der RS-Virus-Reifung) aus demselben infektiösen Überstand einer 8 Tage lang mit RS-Viren infizierten Zellkultur. Die zahlreichen "buds", die die gesamte Oberfläche der infizierten Zelle bedecken, entsprechen in der 2-dimensionalen Darstellung im Transmissions-Elektronenmikroskop den Zellmembran-Ausstülpungen. In der hier gezeigten 3-dimensionalen Darstellung erscheinen sie als rundliche Knöpfe, die möglicherweise der runden Form der RS-Virus-Partikel entsprechen.

Abb.22: Darstellung des durch RS-Viren bedingten "budding"-Prozesses an der Plasmamembran einer HEP-2-Zelle im Rasterelektronen-Mikroskop bei 2550-facher Vergrößerung

Abb.23: Vergrößerung eines Ausschnittes der Abb.22, die die "buds" bei 6500 x Vergrößerung besser demonstriert

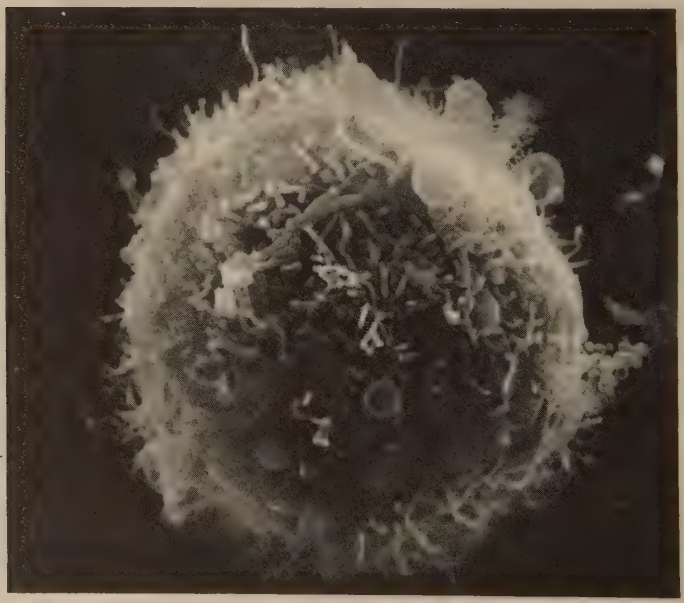


Abb.24: HEP-2-Zelle (8 Tage post infect.) mit zahlreichen filamentösen Ausstülpungen an der Zellmembran-Oberfläche und einigen rundlichen "buds" bei 2500 x Vergrößerung

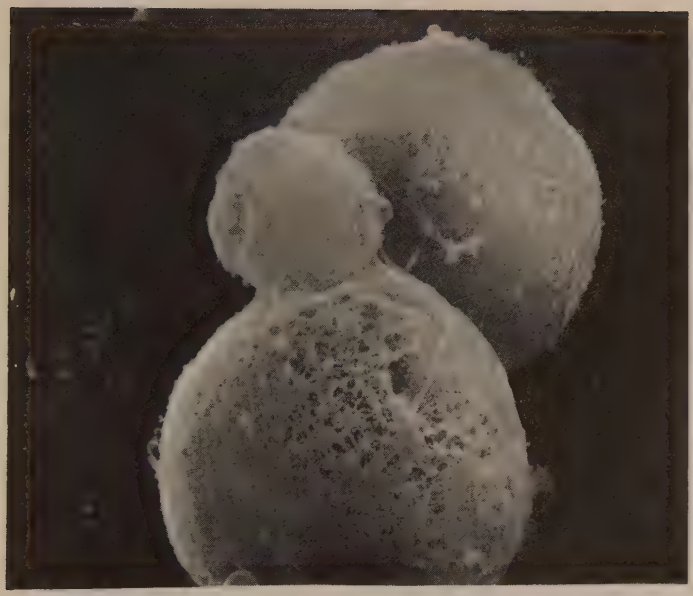


Abb. 25: Abgestorbene HEP-2-Zellen (8Tage post infect.) mit RS-Virus-bedingten Löchern in der Zellmembran (2000x)

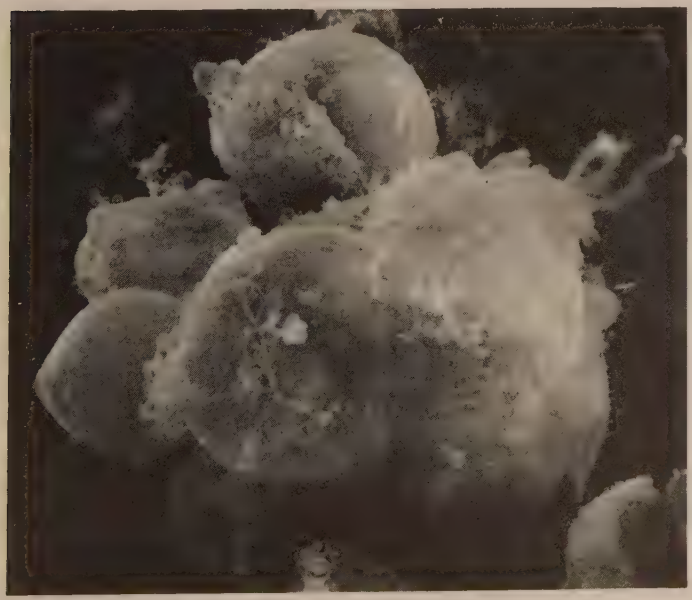


Abb. 26: Zerfallendes Syncytium aus HEP-2-Zellen (aufgrund der Autolyse oder der destruierenden RS-Virus-Wirkung (?)) im Überstand einer 8 Tage infizierten Kultur (1360 x)

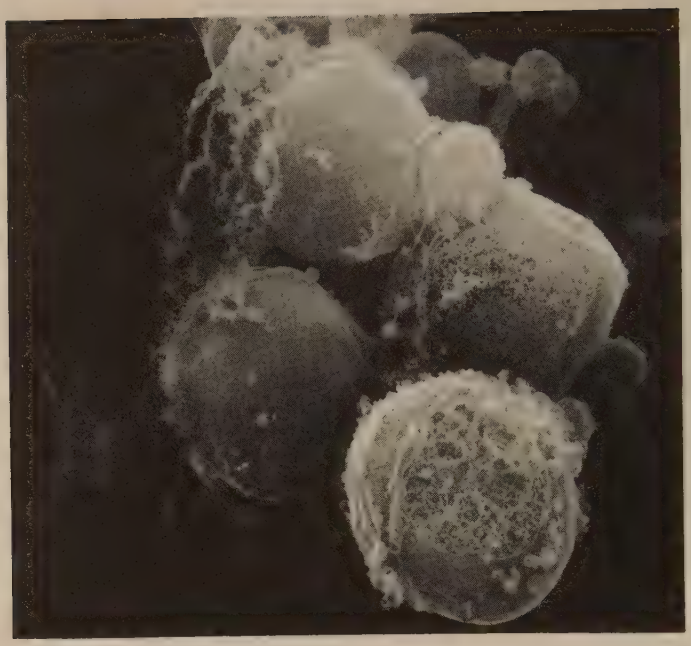


Abb.27: Rasterelektronenmikroskopische Darstellung einiger agglomerierter HEP-2-Zellen bei 1460-facher Vergrößerung aus dem infektiösen Überstand einer seit über 8 Tagen mit RS-Viren inokulierten HEP-2-Zellkultur. Zu diesem Zeitpunkt finden sich vor allem Membranveränderungen der Zellen, die dann nur noch wenige "buds" und filamentöse Strukturen aufweisen. Diese treten in den ersten Tagen der RS-Virus-Infektion recht häufig und deutlich ausgeprägt als spezifische RS-Virus-bedingte Veränderung auf den Oberflächen der infizierten Zellen auf und verleihen ihrer Plasmamembran ein oft fransenartiges Aussehen, wie in den folgenden rasterelektronenmikroskopischen Abbildungen zum Ausdruck kommt.

Der makroskopisch als trübe Suspension erscheinende infektiöse Überstand einer 10 Tage alten und seit 8 Tagen mit RS-Viren infizierten HEP-2-Zellkultur bestand bei elektronenmikroskopischer Betrachtung demnach aus zahlreichen Zelltrümmern, toten Zellen mit porösen Membranstrukturen, sowie den ihnen anhaftenden bzw. aus ihnen herausragenden fibrillösmembranösen Fransen und wohl auch freien RS-Virus-Partikeln.

2.3. Untersuchung und Charakterisierung des RS-Virus mit dem Raster- (SEM) und Transmissions-Elektronenmikroskop (TEM) und seine ultrastrukturellen Besonderheiten

2.3.1. Rasterelektronenmikroskopische Darstellung des für RS-Viren charakteristischen CPE's

Die Heranreifung des RS-Virus geschieht durch einen "budding"-Prozess an der Plasmamembran der infizierten Wirtszelle (NORRBY et al., 1970; BÄCHI and HOWE, 1973).
Die Außenmembran des RS-Virus-Partikels ist durch Fortsätze an ihrer Oberfläche bedeckt, die der Virushülle ein fransenartiges Aussehen in negativ-kontrastierten Präparaten im TEM verleihen (BLOTH et al., 1963; BÄCHI and HOWE, 1973; BERTHI-AUME et al., 1974).
WUNNER und PRINGLE (1976) fanden bei ihren elektronenmikroskopischen Untersuchungen von selbst isolierten RSV-Protein-Fraktionen, die ein Maximum an Infektiosität enthielten, runde pleomorphe RS-Viruspartikel und zusätzlich einen unterschiedlich großen Anteil von filamentösem Material, welches mit fransenartigen Membranfortsätzen versehen war oder auch nicht. Dieser flaumige Saum ("fuzzy coat") um die RS-Viruspartikel ist jedoch nicht identisch mit dem an der Wirtszell-Membran stattfindenden, viral bedingten "budding"-Prozess, der quasi um eine Zehnerpotenz in seiner räumlichen Ausdehnung größer sein dürfte.
Beobachtungen mittels Immunfluoreszenz und Rasterelektronenmikroskop haben ergeben (WUNNER et al., 1976), daß die Infektion von "BS-C-1"-Zellen mit RS-Viren eine reichliche Ausbildung von langen dünnen Filamenten über die gesamte Oberfläche der infizierten Zelle bewirkt.
Dasselbe Phänomen tritt auch an mit RS-Viren infizierten HEP-2-Zellen auf, wie die folgenden rasterelektronenmikroskopischen Bilder (SEM-Bilder) zeigen sollen, die ich gemeinsam mit Herrn CLAVIEZ im Max-Planck-Institut für Virusforschung, Tübingen machte (Frühjahr 1977).
Hierbei handelt es sich um das rasterelektronenmikroskopische Korrelat der bereits unter Punkt IV.2.1. geschilderten,

lichtmikroskopisch erkennbaren cytopathischen HEP-2-Zellveränderungen unter dem Einfluß des RS-Virus.
Diesmal wurde für die SEM-Untersuchungen das zu präparierende Material nicht aus dem infektiösen Überstand entnommen, sondern kleine Deckgläschen von 10 mm Durchmesser wurden unter sterilen Bedingungen (durch vorherige 10 minütige UV-Bestrahlung beider Flächen) in eine der ebenfalls sterilen Vier-Kant-Flaschen gebracht. Sie lagen auf der Bodenfläche der Kulturflasche, in der die anschließend zugegebene, in Wachstumsmedium suspendierte, frische Passage von HEP-2-Zellen wuchs. Nach Aufbewahrung bei einer Temperatur von 37°C hatte sich 2 Tage später ein vollkommen dichter Zellrasen gebildet. Dann war auch die obere Fläche der zugegebenen Deckgläschen, die später in das Rasterelektronenmikroskop nach der entsprechenden Präparation des sich darauf befindenden Materials eingefahren wurden, mit den Zellen ganz überwachsen.
Es erfolgte die RS-Virus-Inokulation, wie bereits beschrieben, und die Inkubation der infizierten HEP-2-Zellkultur bei 34°C. Nach 72 Stunden wurden die infizierten "monolayer-Zellen" bei einem lichtmikroskopisch sichtbaren CPE von 3 + mit 2,5 % Glutaraldehyd (in PBS, pH 7,2) fixiert. Dabei wurden unmittelbar nach dem raschen Abkippen des Überstandes 15 ml des 2,5 %igen Glutaraldehyds in die Vier-Kant-Flasche mit den Deckgläschen dazugegeben, die dann mit einer Pinzette vorsichtig aus der Kulturflasche entnommen, in frischen Glutaraldehyd gelegt und dann für einige Stunden bei + 4°C im Kühlschrank aufbewahrt wurden.
Auf den weiteren Präparationsgang für die SEM-Darstellung dieser Präparate (HEP-2-Zellen 72 Stunden nach der Infektion mit RS-Viren) wird hier verzichtet.
Bei der anschließenden Betrachtung des fertigen Präparates im Rasterelektronenmikroskop fiel bereits bei einer relativ geringen Vergrößerung (180-fach) auf, daß die 72 Stunden zuvor mit RS-Viren inokulierten HEP-2-Zellen mit zahlreichen filamentösen Fortsätzen (Membranfransen) versehen waren, die die gesamte Oberfläche der Zellmembran überzogen.
Dies demonstriert bereits das folgende Übersichtsbild.

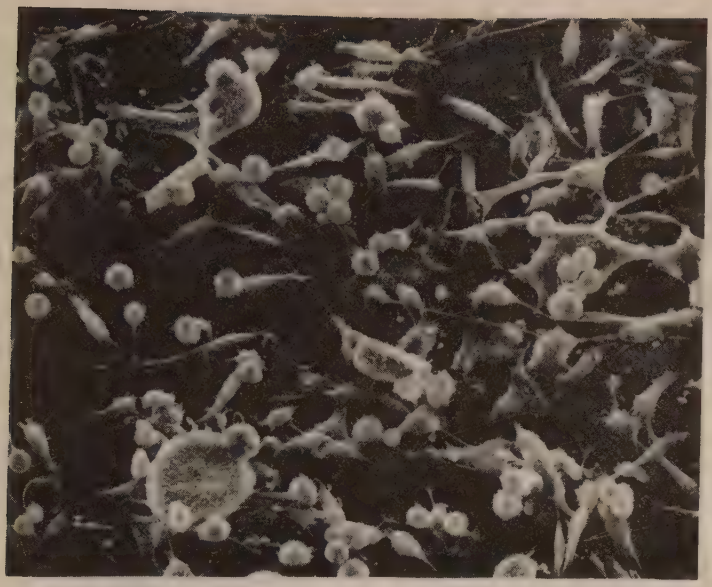


Abb.28: SEM-Übersichtsbild (180-fach vergrößert) zeigt die bereits 72 Stunden post infect. auftretende und für das RS-Virus charakt. Bildung v.syncyt. Riesenzellen

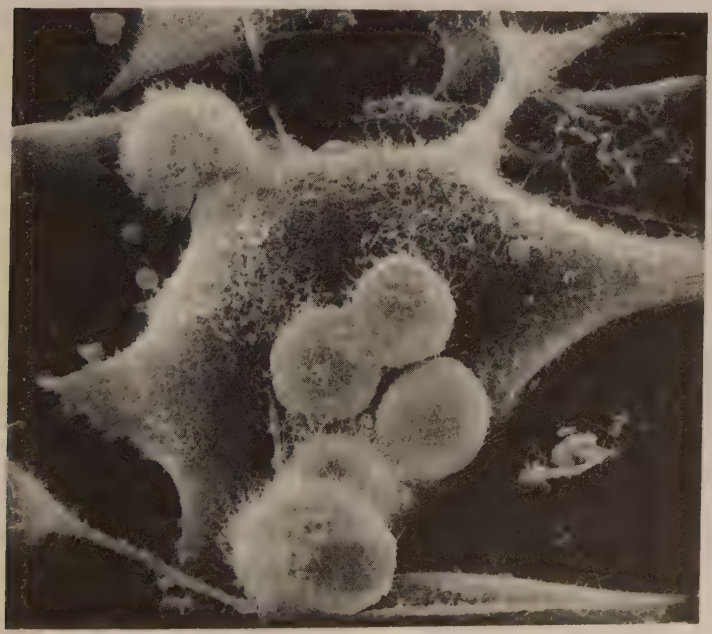


Abb.29: SEM-Detailaufnahme einer durch RS-Viren nach 72 Std. auf HEP-2-Zellen gebildeten Riesenzelle aus dem rechten mittleren Abschnitt der Abb.28 bei 875 x Vergrößerung

In dieser Abbildung werden die zahlreichen, die gesamte Oberfläche der Plasmamembran der Riesenzelle überziehenden, filamentösen Fortsätze (Membranfransen) noch deutlicher demonstriert.
Das nächste rasterelektronenmikroskopische Bild (SEM-Bild) zeigt bei noch stärkerer Vergrößerung (5460-fach) die Membranoberfläche der Riesenzelle im mittleren Bereich mit massenhaft filamentösen Strukturen, die der länglichen-filamentösen Form des RS-Virus-Partikels entsprechen und somit neben den runden pleomorphen Formen des RS-Virus die andere morphologische Struktur dieses Virus darstellen (siehe dazu auch Angaben von BÄCHI and HOWE, 1973 und WUNNER and PRINGLE, 1976).

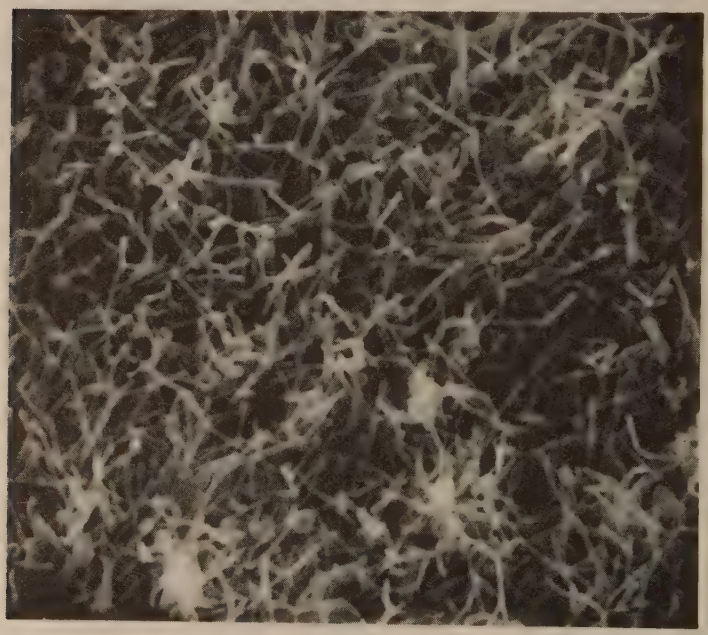


Abb.30: SEM-Bild der Oberfläche der Riesenzelle im mittleren Bereich mit massenhaft filamentösen Strukturen der Plasmamembran bei noch stärkerer Vergrößerung (5460 x)

2.3.2. Darstellung der Ultrastruktur des RS-Virus mit Ultradünnschnitt-Präparaten von RS-Virus-infizierten HEP-2-Zellen im Transmissionselektronenmikroskop

Im Gegensatz zu BÄCHI und HOWE (1973) - die mit RS-Viren infizierte VERO-Zellen für ihre elektronenmikroskopischen Untersuchungen benützten - verwendete ich HEP-2-Zellen, die 72 Stunden nach der RS-Virusinokulation sofort nach Abkippen des Erhaltungsmediums mit 2,5 %igem Glutaraldehyd fixiert wurden.
Der "budding"-Prozess der RS-Viruspartikel an der Wirtszellmembran imponiert als zahlreiche fransenartige Ausläufer in den Ultradünnschnitten im Transmissionselektronenmikroskop bei einer Vergrößerung von 30-40 000 x.

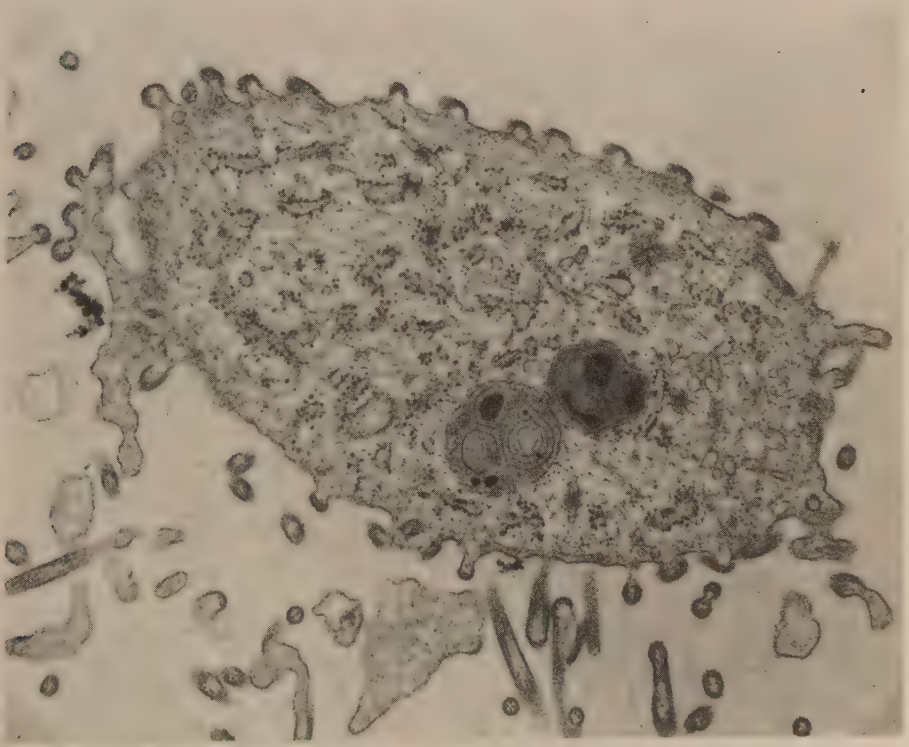


Abb.31: TEM-Übersichtsbild einer mit RS-Viren 72 Stunden vorher infizierten HEP-2-Zelle, die im Ultradünnschnitt-Verfahren präpariert und mit Uranylacetat positiv kontrastiert wurde bei 21 000-facher Vergrößerung

An der Außenseite der Plasmamembran der infizierten HEP-2-Zellen zeichnen sich die "budding areas" (die Regionen der RS-virusbedingten Ausstülpungen) durch das Vorhandensein eines "fuzzy coat" (flaumigen Saums) unterschiedlicher Elektronendichte aus. Dieses Phänomen - sozusagen "ein CPE im Sinne von EM-Veränderungen" ist schon lange vorhanden, bevor lichtmikroskopisch im Invertoskop ein CPE in Form von syncytialen Riesenzellen mit intracytoplasmatischen Einschlußkörpern erkennbar ist. Es wird als "budding"-Vorgang bezeichnet und steht mit der Reifung der RS-Viren an der Zellmembran im Zusammenhang, wie BÄCHI und HOWE (1973) mit ihrer Gefrierätz-Technik zum ersten Mal am RS-Virus zeigen konnten. Mit ihrer Technik der Gefrierätzung hatten sie ein Verfahren, das die einzigartigen strukturellen Merkmale des RS-Virus erkennen läßt, wie es derzeit mit noch keiner anderen Präparationsmethode erreichbar ist.
Diese Technik enthüllte ein strukturelles Merkmal, das nur beim RS-Virus auftritt, nämlich helicale Schichten, die rund um den Viruskern an der Innenseite der Virushülle angeordnet sind. Der Kern zeigt Schichtungen, die noch in keinem anderen mit einer Hülle versehenen Virus vorher gesehen worden waren. Diese (Membran)-Schichten um den Viruskern herum sind mit der Umwandlung von Wirtszellmembranteilen verbunden. Die letzteren werden von den Stellen des aktiven "viralen budding" an der Zellmembran verschoben und finden sich in den zwischen diesen "budding areas" liegenden Bereichen in unregelmäßigen Mustern oder Haufen angeordnet. Das auffällige Zusammentreffen der Syncytienbildung in Zellen durch das RS-Virus mit dem Erscheinen seines Virus-Antigens in der Plasmamembran der infizierten Zellen wurde von LEVINE u. Mitarb. (1971) in mit RS-Virus infizierten Zellen beobachtet.
Bei der versuchsweisen Klassifizierung des RS-Virus zusammen mit dem PVM (pneumonia virus of mice) und dem bovinen RS-Virus als einer separaten Untergruppe der Myxoviren hat die ultrastrukturelle Charakterisierung dieser Viren als Basis gedient (COMPANS et al., 1967; HARTER et al., 1967; JONCAS et al., 1969 und NORRBY et al., 1970).

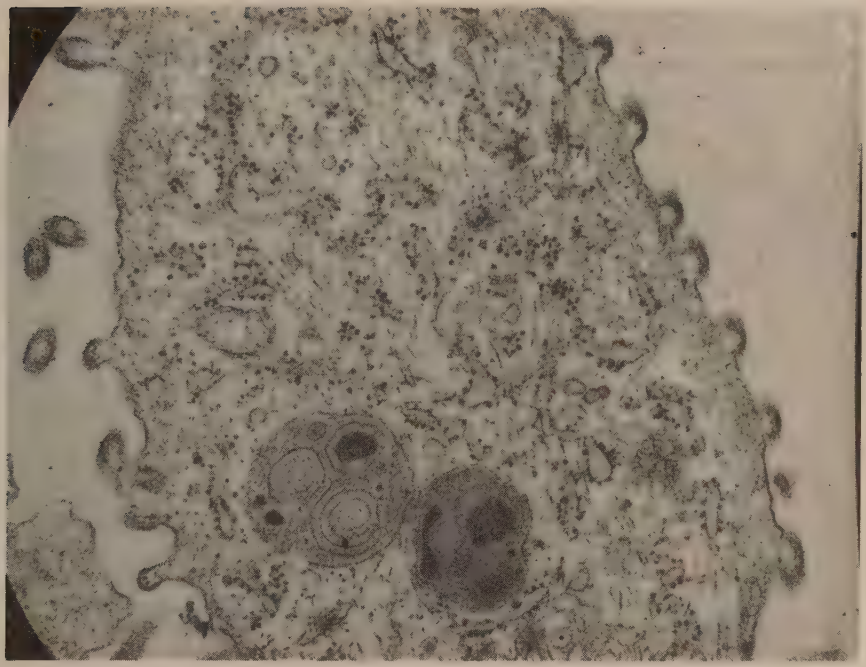


Abb.32: Elektronenmikroskopische Darstellung des CPE von RS-Viren zeigt die Virusreifung an der Zellmembran einer HEP-2-Zelle 72 Stunden post infectionem ("budding"Prozess) bei 31 500-facher Vergrößerung

Neben diesem "budding"-Phänomen an der Zellmembran der mit RS-Viren infizierten HEP-2-Zellen erkennt man im Elektronenmikroskop viele Partikel, die eine große Vielfalt im Erscheinungsbild ihrer inneren Struktur und äußeren Form zeigen. Es fanden sich wie bei BÄCHI und HOWE (1973) alle 4 bekannten unterschiedlichen morphologischen Strukturen des RS-Virus: sowohl runde bis nierenförmige Partikel mit (= komplett) oder ohne (= inkomplett) innerer Struktur, wie auch filamentöse (längliche) Partikel, die leer waren oder eine elektronendichte innere Komponente hatten und gewöhnlich gleichzeitig nebeneinander in den infizierten HEP-2-Zellen auftraten.
Die Dauer der Infektion vor der Fixierung hat keinen Einfluß darauf, mit welcher Häufigkeit diese 4 verschiedenen Formen von RS-Viruspartikeln vorkommen (BÄCHI and HOWE, 1973).

Bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen fiel auf, daß die filamentösen Formen der RS-Viruspartikel häufiger vorkommen als die runden Partikel.

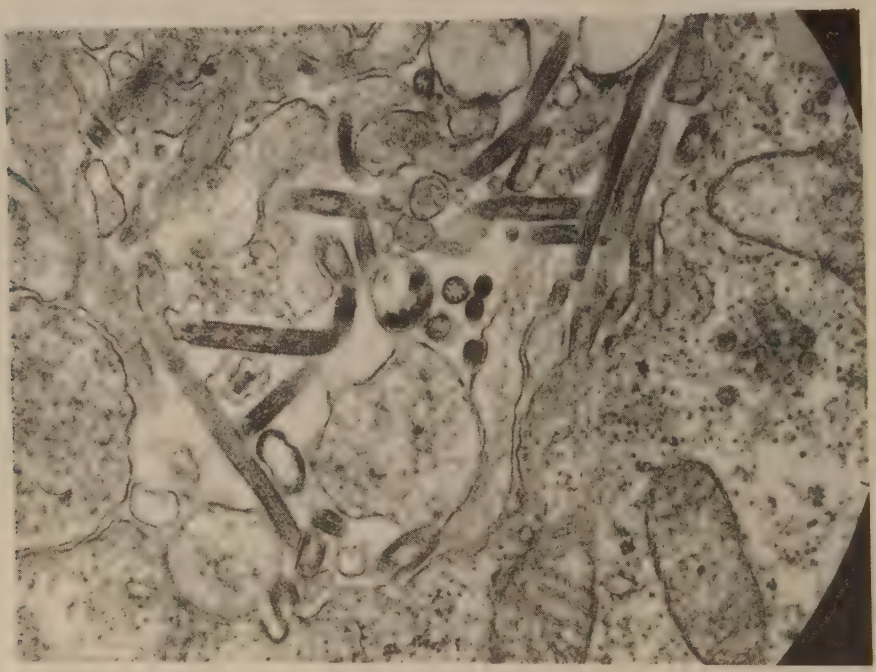


Abb.33: TEM-Bild zeigt die häufiger vorkommenden filamentösen Formen des RS-Virus bei etwa 31 500 x Vergrößerung

Diese Befunde stimmen mit denen von BÄCHI und HOWE (1973) überein, die außerdem feststellen, daß die leeren Filamente (inkomplettes RS-Virus) häufiger vorkommen als die, welche innere Strukturen enthalten (komplettes RS-Virus).
Sowohl die freien Filamente als auch die noch am "budding"-Prozess beteiligten filamentösen Gebilde enthalten nicht immer gut erkennbare innere Strukturen, aber 3-5 parallel verlaufende Streifen (deren Durchmesser nach BÄCHI und HOWE, 1973, 15 nm beträgt) können gelegentlich festgestellt werden in einigen dieser länglichen Virionen, wenn sie im Ultradünnschnitt exakt in einer Ebene getroffen wurden.

Diesselben inneren Strukturen zeigen die Querschnitte dieser Filamente, die dann wie 5-6 elektronendichte Tüpfel oder Punkte (mit einem Durchmesser auch von 15 nm nach BÄCHI und HOWE, 1973) imponieren, wie die folgende EM-Aufnahme zum Ausdruck bringt.

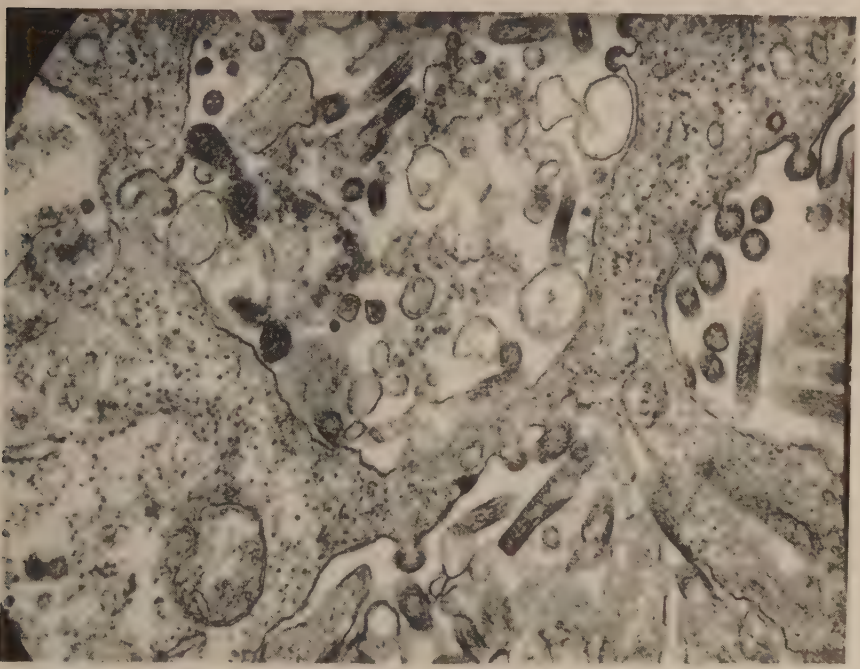


Abb.34: Runde Formen des RS-Virus mit inneren elektronendichten Strukturen (aus Ribonucleoproteiden ?), die im TEM-Bild als Tüpfel imponieren (bei etwa 31 500 x Vergrößerung) u. das komplette runde Virion darstellen

Auch in den runden oder nierenförmigen "budding"-Gebilden der Plasmamembran der infizierten HEP-2-Zelle fanden sich häufig diese tüpfelförmigen elektronendichten Strukturen mit einem Durchmesser von 15 nm. Sie entsprechen wahrscheinlich den Ribonucleoproteiden des RS-Virus. Sie stellen gemeinsam mit den von der Zelle losgelösten rundlichen oder filamentösen Partikeln das vollständige RS-Virus in seinen 2 morphologisch möglichen Strukturen dar, welches in diesen gezeigten Abbildungen etwa einen Durchmesser von 100 nm aufweist.

Dieser wird von KNIGHT (1973) mit 90-130 nm und von JAWETZ und Mitarbeitern (1977) mit 80-120 nm angegeben.
Die filamentösen Ausläufer der infizierten Zellen scheinen verlängerte Nucleocapside des RS-Virus zu sein (KNIGHT, 1973).
Die Virushülle besteht nach den Angaben von BÄCHI und HOWE (1973) aus einer 3-schichtigen Membran, die mit der Wirtszellmembran zusammenhängt. Bei genauerer Betrachtung der Stellen des aktiven viralen "budding"-Prozesses im TEM-Bild erkennt man, daß die RS-Viren mit der Wirtszellmembran durch einen kurzen Stiel verbunden sind, der durch undifferenzierte Wirtszellmembran gebildet wird (siehe insbes. Abb.31 u. 32).
Bei noch stärkerer, hier nicht dargestellter Vergrößerung fanden BÄCHI und HOWE (1973) außerdem, daß von der RS-Virushülle regelmäßig angeordnete spikes vorspringen, so wie bei den anderen Paramyxoviren. Aber trotz dieser Strukturen, die den Hämagglutininen ähneln, ist das RS-Virus nicht in der Lage, zu hämagglutinieren oder rote Blutkörperchen zu hämolysieren und wird deshalb auch einer neuen Gruppe, den Metamyxoviren bzw. Pneumoviren zugeordnet (JAWETZ et al., 1977).
Im Gegensatz zu anderen Para- und Orthomyxoviren hat es neben dem fehlenden Hämagglutinin auch keine Neuraminidase-Aktivität (RICHMAN et al., 1971).

3. Optimierung der RS-Virus-Antigen-Präparation durch Anwendung verschiedener Methoden

Wie in Tabelle 1 (auf Seite 29) dargestellt ist, war das bei Anwendung der Methode von TOMIYANA (1975) präparativ gewonnene RSV-Antigen aus auf VERO-Zellen gezüchtetem RS-Virus-Material bezüglich seiner komplementbindenden Aktivität entgegen den ursprünglichen Erwartungen nicht sehr überzeugend. Der dabei erzielte RSV-Antigen-Titer war nicht sehr hoch. Er zeigte lediglich bei der unverdünnten RSV-Antigen-Konzentration K_o bis zu einer Verdünnung des spezifischen Immunserums von 1:40 eine 3-fach positive Reaktion.
Wie in Tabelle 2 (auf Seite 31) dargestellt ist, konnte anhand der mit dem RSV-Antigen Nr. 2 in der KBR erzielten

Ergebnisse im Vergleich zu denen, wie sie mit dem RSV-Antigen Nr. 3 erreicht wurden, eine deutlich unterschiedliche komplementbindende Aktivität zwischen beiden Antigenen festgestellt werden. Dies erstaunt umso mehr, wenn man berücksichtigt, daß dasselbe RS-Saatvirus verwendet und unter jeweils identischen Bedingungen auf denselben Zellen der gleichen Zellinie gezüchtet wurde. Allerdings war die Zellpassagezahl unterschiedlich hoch, und die infizierten HEP-2-Zellen, aus denen das RSV-Antigen Nr. 3 hergestellt wurde, zeigten optisch viel ausgeprägtere cytopathische Veränderungen und waren jünger bei der Virusinokulation als die HEP-2-Zellen, aus denen das RSV-Antigen Nr. 2 gewonnen wurde.

Somit kann zusammenfassend aus den Ergebnissen dieser KBR-Versuchsreihe entnommen werden, daß die Güte des nach derselben Präparationsmethode gewonnenen RSV-Antigens unter anderem von der Zellpassage-Zahl der infizierten Wirtszellen, d.h. von ihrem Alter abhängt und bei jungen Wirtszellen viel besser ist. Als ein Parameter für die Güte des nach derselben Präparation zu erwartenden RSV-Antigens kann eventuell als lichtmikroskopisches Kriterium der Ausprägungsgrad der auf damit infizierten Zellkulturen verursachten cytopathischen Veränderungen (nach demselben Zeitraum der RS-Virusinokulation) herangezogen werden.

Tabelle 3 (auf Seite 34) ermöglicht eine vergleichende Beurteilung der jeweiligen Ergiebigkeit der RSV-Antigen-Präparation nach der Methode von TOMIYANA bzw. nach der "Inkubationsmethode" anhand der mit der KBR erhaltenen Resultate. Hierbei fällt auf, daß die ersten 5, nach der Methode von TOMIYANA präparierten Chargen (Nr.1 - Nr.5) bezüglich dem gewonnenen RSV-Antigen weitgehend dasselbe Ergebnis zeigen.

Die nächsten 5 nach der "Inkubationsmethode" präparierten Chargen (Nr.6 - Nr.10) zeigen bezüglich des gewonnenen RSV-Antigens im Vergleich zu den ersten 5 in der KBR durchweg schlechtere Ergebnisse, außer bei der Charge Nr. 10. Diese wurde im Gegensatz zu den Chargen der Nr.6 - 9 nicht

bei - 20°C eingefroren und bei dieser Temperatur für einige Tage bis zum Wiederauftauen für die Verwendung in der vergleichenden KBR-Versuchsreihe aufbewahrt, sondern wurde unmittelbar nach Beendigung der Präparation sofort als Antigen in der KBR verarbeitet. Dabei ergaben sich mindestens genauso gute Ergebnisse wie bei der Präparationsmethode des RSV-Antigens nach TOMIYANA.
Ebenso verhielt es sich mit dem Material der Chargen Nr.11 und Nr.12, bei denen das nach der Zentrifugation anfallende Sediment (im Gegensatz zu der Präparation der Chargen Nr.6 bis Nr.10) nicht verworfen, sondern im Überstand suspendiert als RSV-Antigen bei der KBR benutzt wurde.
Als Erklärung für die hiermit erzielten, guten Ergebnisse bietet sich die Vorstellung an, daß möglicherweise noch zellassoziiertes RSV-Antigen in diesem Sediment enthalten ist. Die Freisetzung gerade dieser RSV-Antigen-Komponente mit ihrer hohen komplementbindenden Aktivität erfolgt durch die thermische Aufschließung der infizierten Zellen durch unmittelbar hintereinander erfolgendes 5 maliges Einfrieren und Auftauen wohl in einem größeren Umfang, als es durch die Destruktion der infizierten HEP-2-Zellen durch das RS-Virus selbst und/oder (?) durch die Autolyse der Zellen möglich ist (nach erfolgter 10 tägiger Inkubation ab einem CPE von 4 +).

3.1. Einschränkung der Aussagekraft der KBR

Bezüglich des Ausfalls der Reaktionen in Patienten-Seren, die zur Diagnostik einer RSV-Infektion oder für immunologische Durchseuchungsstudien herangezogen werden, ergibt sich noch eine zusätzliche Schwierigkeit: dem Nachweis komplementbindender Antikörper sind zeitlich relativ enge Grenzen gesetzt. Dies ist aus den Antikörper-Titer-Verlaufskurven der 4 Meerschweinchen ersichtlich. Sie stellen in der vergleichenden KBR im Prinzip jeweils eine fallende, also negative, näherungsweise logarithmische Funktion dar (siehe Abb.4 und 5 auf Seite 40 und 41) bei Verwendung der zwei, auf unterschiedliche Weise präparierten, Komponenten des

RS-Virus. Diese wurden, in Abhängigkeit vom Präparationsverfahren (nach der Methode von TOMIYANA bzw. nach der "Inkubationsmethode") in unterschiedlich großem Ausmaß überwiegend als intrazelluläres, zellassoziiertes RSV-Antigen von hoher komplementbindender Aktivität bzw. als überwiegend extrazelluläres Oberflächen-Antigen des RS-Virus von geringerer komplementbindender Kapazität gewonnen (siehe dazu KNIGHT, 1973).
Die aus den Werten der entsprechenden Komplementbindungsreaktionen erhaltenen Kurven (Seite 40 und 41) zeigen die Höhe der jeweiligen Antikörper-Spiegel als Funktion der Zeit über einen Zeitraum von 10 Wochen post infectionem hinweg. Ihre Abnahme als Funktion der Zeit im logarithmischen Maßstab bei allen 4 Versuchstieren läßt erkennen, daß generell ein rascher Abfall der komplementbindenden Serum-Antikörper gegen das RS-Virus vorhanden ist. Wenn auch die absolute Höhe der Antikörper-Titer der einzelnen Meerschweinchen zueinander verschieden groß ist (biologische Streuung), wird deutlich, daß die Titer in einem unterschiedlich starken Ausmaß mit der Zeit abfallen, je nach Verwendung des auf unterschiedliche Weise präparierten RSV-Antigens.
Bei der Beurteilung dieser Kurven fällt außerdem auf, daß sie je nach Versuchstier in unterschiedlich starkem Ausmaß mit der Zeit abfallen. Dieses Phänomen dürfte Ausdruck der individuell verschieden starken Reaktionsbereitschaft in Form der Bildung komplementbindender Antikörper gegen eine RS-Virusinfektion sein.
Es wird ebenfalls von WILCZYNSKI in seiner 1976 erschienenen Arbeit über "RS-Virus Components" erwähnt. Er beschreibt in diesem Zusammenhang die Präparation von RS-Virus-Komponenten, welche als Antigene für die Immunisierung von Kaninchen verwendet wurden. Außer gegen diese - unterschiedlich schweren, nach Zentrifugation und Chromatographie gewonnenen - RS-Virus-Protein-Komponenten wurden in den Kaninchen Antiseren gegen das vollständige RS-Virus , d.h. dem Überstand infizierter HEP-2-Zellkulturen mit einem vollständigen CPE, der für 20 Minuten bei 14 000 U/min zentrifugiert worden war, gewonnen.

Dabei fand er, daß die Antigenität des RS-Virus parallel mit seiner Zerstückelung abnimmt. Es ist jedoch eine Tatsache, daß die serologische Antwort von Tieren, die gegen das RS-Virus immunisiert wurden, nicht immer diesselbe ist, denn auch bei WILCZYNSKI (1976) entwickelten einige Tiere, die mit identischem RS-Virus-Material auf diesselbe Weise immunisiert wurden, einen hohen Antikörper-Spiegel, während andere einen niederen Titer oder gar keine nachweisbaren Antikörper hatten.
Somit ist festzustellen, daß der Titerverlauf der komplementbindenden Antikörper gegen das RS-Virus sowohl eine Funktion der Güte des applizierten RS-Virus-Antigens als auch der Zeit nach der Infektion ist. Die 2 RSV-Antigene, die durch die Anwendung unterschiedlicher Präparationsmethoden gewonnen wurden, ergaben (in Abhängigkeit von ihrer unterschiedlichen Qualität und/oder Ausbeute an komplementbindender Aktivität der zellassoziierten RS-Virus-Komponente) in der vergleichenden KBR jeweils einen unterschiedlich hohen Titer. Dieser fällt aber mit der Zeit in einem gleich starken Ausmaß ab. Das heißt, daß das Steigungsmaß der beiden sich jeweils entsprechenden (der insgesamt 8) Verlaufskurven der RS-Virus-Antikörper-Titer miteinander korreliert, obwohl sich diese beiden Antigene weniger in der quantitativen Ausbeute als vielmehr in der qualitativen Gewinnung vor allem des zellassoziierten (intrazellulären) RSV-Antigens mit hoher komplementbindender Kapazität unterscheiden.
Damit dürfte die unterschiedliche Empfindlichkeit der KBR weniger von der Quantität als vielmehr von der Qualität des RSV-Antigens abhängig sein (in Abhängigkeit vom angewandten Präparationsverfahren). Hierbei fällt ebenfalls auf, daß das nach der zwar aufwendigeren Präparationsmethode von TOMIYANA gewonnene RSV-Antigen bessere Resultate in der KBR liefert, als das, welches nach der "Inkubationsmethode" gewonnen wurde.
HAMBLING (1966) fand bei Meerschweinchen, die intranasal mit lebendem RS-Virus aktiv immunisiert worden waren, daß ein Teil dieser Tiere sowohl neutralisierende wie komplementbindende Antikörper gegen dieses Virus, der andere Teil nur eine Art dieser Antikörper entwickelt hatte.

Dagegen berichten BERGLUND, MÄNTYJÄRVI und SALMI (1967), daß diese Tiere alle Antikörper-Arten gegen das RS-Virus bilden würden. Auch FORSYTH, COATES und CHANOCK (1966) immunisierten Meerschweinchen mit zwei verschiedenen Fraktionen des löslichen Antigens von RS-Viren. Sie fanden, daß eine Fraktion nur die Bildung homologer CF-Antikörper induzierte, wobei einige Tiere auch einen niederen Titer an neutralisierenden Antikörpern bildeten, die länger als die komplementbindenden (CF-) Antikörper persistierten.

Während die komplementbindenden Antikörper mit der Zeit rasch abfallen (die Kurven auf Seite 40 und 41 nähern sich asymptotisch gegen Null) läßt sich bei vielen Individuen einer Population ein gewisser, wenn auch niederer Titer von neutralisierenden Antikörpern über einen sehr langen Zeitraum nachweisen.

Es ist schwierig, hohe und reproduzierbare Titer von Antikörpern gegen das RS-Virus in Seren einzelner Tiere und Menschen zu erhalten (WILCZYNSKI, 1976). Bei ihm betrugen die höchsten, in der KBR erreichten Antikörper-Spiegel der mit RS-Virus-Komponenten immunisierten Kaninchen 1:128, aber auch nur bei Verwendung des gesamten RS-Virus oder seiner leichten Komponente als Antigen; bei Verwendung der anderen RS-Virus-Komponenten lagen die Werte beträchtlich tiefer!

Im Vergleich dazu lag der höchste Titer in meinen Versuchen mit den 4, mit RS-Viren infizierten Meerschweinchen, bei 1:160 (bzw. 1:110), der tiefste bei 1:70 (bzw. 1:40) bei der ersten Blutabnahme 3 Wochen nach der experimentellen Infektion der Tiere. Er fiel dann innerhalb von 6 Wochen bzw. 10 Wochen post infectionem bis zur dritten und damit letzten Blutabnahme von jeweils 5 ml durch intracardiale Punktion auf Werte von 1:70 (bzw. 1:50) als obere Grenze bzw. von 1:30 (bzw. 1:20) als untere Grenze ab.

Nach FUKUMI (1975) ist der Spiegel der cirkulierenden komplementbindenden Antikörper ein signifikanter Hinweis auf das Angehen einer Infektion mit RS- bzw. Parainfluenza-3-Viren. Die Wahrscheinlichkeit der Manifestation einer Infektion mit diesen beiden Viren korreliert mit dem Spiegel dieser Antikörper, obwohl auch die sekretorischen Antikörper hierbei eine sehr wichtige Rolle spielen.

3.2. Einfluß der Zellaufschließung auf die Güte des RSV-Ag's

Die in Tabelle 5 auf Seite 45 zusammengefaßten Ergebnisse ergaben sich aus der vergleichenden KBR von 3 RSV-Antigenen, die bezüglich der Zellaufschließung nach etwas modifizierten Präparationsmethoden gewonnen wurden unter Verwendung desselben spezifischen Immunserums, welches bereits schon bei den RSV-Antigenen der Tabelle 1-3 benutzt wurde. Bei der Betrachtung dieser Ergebnisse fällt auf, daß es trotz vorliegender identischer Bedingungen der RS-Viruszüchtung auf jeweils dichten HEP-2-Zellrasen derselben Passage-Nummer, die gleichzeitig mit derselben Menge RS-Saatvirus inokuliert wurden, gewisse Unterschiede gibt in der qualitativen und/oder quantitativen Ausbeute an komplementbindendem RSV-Antigen. Während die Chargen für das RSV-Antigen Nr. 4 und Nr. 5 noch weitere 10 Tage bei 37°C inkubiert wurden zur Zelldestruktion durch das Virus bzw. zur Autolyse der Zellen, wurde das RSV-Material für das RSV-Antigen Nr. 3 nach 4-tägiger Infektion bei einem CPE von 4 + abgeerntet und nach einer Variation der Methode von TOMIYANA präpariert.
Die Ergebnisse der vergleichenden KBR mit diesen 3 Antigenen machen deutlich, daß die ihnen zugrunde liegende unterschiedlich intensive Aufbrechung der infizierten Wirtszellen, die sie als wesentliches und die RSV-Antigene Nr.4 und Nr.5 als einziges Kriterium voneinander unterscheidet, doch einen recht erheblichen Einfluß auf die Güte des dabei gewonnenen komplementbindenden RSV-Antigens hat.
Somit kann festgestellt werden, daß sich die Unterschiede in der Empfindlichkeit der KBR unter anderem auch aus der verschiedenen Technik der Zellaufschließung (v.a. durch Ultraschall) ergeben. Von der Art und Güte, also von der Qualität des verwendeten RSV-Antigens hängt die Aussagekraft der KBR ab, wie auch ADAMCZYK (1971) zum Ausdruck bringt.
Es ist wichtig, daß zur Gewinnung einer möglichst hohen Konzentration an komplementbindendem RSV-Antigen nach dem Prinzip der Antigen-Optimierung verfahren wird und u.a. eine möglichst maximale Zerschlagung und Knackung der infizierten, RS-virushaltigen Wirtszellen erfolgt. Dadurch wird diejenige RS-Virus-Komponente mit der hohen komplementbindenden Aktivi-

tät frei, die nach KNIGHT (1973) intrazellulär liegt, also das zellgebundene (zellassoziierte) RSV-Antigen darstellt. Mit der Gewinnung des RSV-Antigens Nr. 5 unter Anwendung der sog."Kombinationsmethode" (siehe Punkt IV.1.7.) schien einigermaßen die Technik der "optimalen" RSV-Antigen-Präparation gelungen zu sein, wie die Ergebnisse der vergleichenden KBR in Tabelle 5 (Seite 45) bestätigen.

4. Epidemiologisch-serologische Besonderheiten bezüglich der Verbreitung von RS-Virus-Infektionen

Mit dem durch Optimierung der RS-Virus-Züchtung und Antigen-Präparation gewonnenen komplementbindenden RSV-Antigen wurde eine serologische Studie an 523 verschiedenen Einzelseren aus dem Tübinger Raum durchgeführt, um das aktuelle epidemiologische Geschehen in diesem Gebiet mit Hilfe der Komplementbindungsreaktion bei Seren gesunder Erwachsener zu verfolgen und aus den gefundenen Ergebnissen allgemein verwertbare Schlüsse zu ziehen. Insbesondere sollte hierbei gezeigt werden - durch den Vergleich dieser Ergebnisse mit den Resultaten früherer epidemiologischer, ebenfalls mit der KBR durchgeführter Untersuchungen an einem ähnlichen Patientengut in diesem Raum (vor allem von SCHERBAUM, W. in seiner 1975 verfaßten Dissertation über "Serologisch-epidemiologische Untersuchungen mit Hilfe der Komplementbindungsreaktion. Respiratorische Viren im Raume Tübingen") - welchen Einfluß das dabei verwendete RSV-Antigen hat, bzw. daß die Aussagekraft der KBR vom verwendeten RSV-Antigen abhängig ist (siehe dazu auch die Arbeiten von ADAMCZYK, 1971 über "Vergleichende Untersuchungen mit dem Neutralisations-Test und der Komplementbindungsreaktion bei der Diagnostik von RS-Virus-Infektionen") und daß durch eine möglichst optimale Präparation des RSV-Antigens die Empfindlichkeit der KBR erheblich gesteigert werden kann. Hierbei kann ein so hochwertiges komplementbindendes Antigen entstehen, das in der KBR zu Ergebnissen führt, die (wie ADAMCZYK 1971 zeigte) zu weitgehender Übereinstimmung führen mit denen, die durch den Neutralisations-Test (NT) erzielt wurden, obwohl der NT empfindlicher und damit spezifischer ist und besonders bei

Erkrankungen von Kleinstkindern der KBR überlegen sein soll. Die geringere Empfindlichkeit der KBR gegenüber dem NT liegt vor allem in der Schwierigkeit, ein ausreichend konzentriertes und hochwertiges, komplementbindendes (CF-) Antigen herzustellen.

Da es jedoch sehr schwierig ist, mit diesem eingesandten Serummaterial eine Querschnittsbevölkerung aufzuzeichnen, können Rückschlüsse auf das epidemiologische Verhalten der Gesamtbevölkerung unseres Raumes gegenüber dem RS-Virus bzw. gegenüber respiratorischen Viren allgemein nur mit einer gewissen Zurückhaltung gezogen werden. Sie sind überhaupt erst nach einer vorherigen Analyse der Zusammensetzung dieses Serummaterials,wie dies auf den Seiten 46, 47, 50, 51 und 52 versucht wurde, einigermaßen möglich.

Aufgrund der Tatsache, daß die Häufigkeit und Ausbreitung von RS- und anderen Virus-Infektionen von einer Vielzahl regionaler Faktoren (geograph. Lage, Alter, familiäre Situation, Beruf, Schichtzugehörigkeit usw.) abhängt und eine deutliche jahreszeitliche Verteilung bezüglich der Häufigkeit des Auftretens dieser Infektion besteht, die gewissen jährlichen und sogar monatlichen Schwankungen unterworfen ist, dürfen die Resultate anderer, bereits früher durchgeführter Untersuchungen (insbesondere solcher, die sich auf andere Kontinente beziehen) lediglich im Sinne von allgemeinen serologischen Aussagen verstanden werden.

Bei dem von mir im Tübinger Raum durch die Untersuchung von 523 Seren gefundenen epidemiologischen Verhalten des RS-Virus ergaben sich einige interessante Tatbestände bezüglich:

Alter: Wie aus Tabelle 7 auf Seite 47 hervorgeht, waren die höchsten Einzeltiter von komplementbindenden Antikörpern gegen das RS-Virus und der prozentual größte Durchseuchungsgrad mit diesem Virus durchweg bei den jüngeren Altersgruppen (15-25 Jahre) festzustellen.

Bei den 145 Frauen der jüngeren Altersgruppe (15-25 Jährige), die sich aus deutschen Frauen und Ausländerinnen zusammensetzten, hatten insgesamt 64 positive Antikörper-Titer gegen RS-Viren. Ein Vergleich dieser Gruppe mit der älteren Altersgruppe (bestehend aus 216 deutschen und ausländischen Frauen),

die sich aus 26 Jährigen und Älteren mit 62 RSV-Antikörper-positiven Befunden zusammensetzte, ergab nach χ^2-Test und YATES-Korrektur bei einem Signifikanzniveau $\alpha = 0{,}05$ einen statistisch signifikanten Unterschied.
Eine weitere Aufschlüsselung dieser beiden Altersgruppen in insgesamt 268 deutsche Frauen und 93 Ausländerinnen ergab bei 104 deutschen Frauen der 15-25 Jährigen mit 44 positiven Befunden bzw. bei 164 deutschen Frauen der 26 Jährigen und Älteren mit 41 positiven Befunden ein Signifikanzniveau $\alpha = 0{,}025$ (χ^2-Test mit YATES-Korrektur) und damit ebenfalls einen statistisch signifikanten Unterschied.
Bei 41 jüngeren (15-25 Jährigen) Ausländerinnen mit 20 positiven RSV-Ak-Titern bzw. 52 älteren (26 Jahre und mehr) Ausländerinnen mit 21 positiven Titern ließen sich statistisch signifikante Unterschiede nicht nachweisen. Das heißt, hier konnte die Hypothese, daß keine Signifikanz bestehe, mit dem χ^2-Test nicht verworfen werden. Ob hier ein signifikanter Unterschied vorliegt oder nicht, läßt sich mit diesem Test nicht nachweisen.
Es erfolgte die Unterteilung der Altersgruppe der 15-25 Jährigen in 79 Arbeiterinnen bzw. Frauen von Arbeitern mit 40 positiven Titern und in 66 Nichtarbeiterinnen bzw. Frauen von Nichtarbeitern mit 24 positiven Titern. Genauso verfahren wurde mit der Altersgruppe der über 26 Jährigen, wobei sich 83 Arbeiterinnen bzw. Frauen von Arbeitern mit 31 positiven Titern und 133 Nichtarbeiterinnen bzw. Frauen von Nichtarbeitern mit 31 positiven Titern gegen das RS-Virus ergaben.
Ein Vergleich auf statistisch signifikante Unterschiede bezüglich der Titerhäufigkeit zwischen den beiden Altersgruppen ergab für die Arbeiterinnen mit χ^2-Test und YATES-Korrektur keine Signifikanz, jedoch mit demselben Test ohne YATES-Korrektur ein Signifikanzniveau $\alpha = 0{,}1$.
Der Vergleich zwischen den beiden Altersgruppen bei den Nichtarbeiterinnen mit χ^2-Test und YATES-Korrektur ergab bei einem Signifikanzniveau $\alpha = 0{,}1$ einen statistisch signifikanten Unterschied.
Geschlecht: Die Häufigkeit von Antikörpern gegen RS-Viren ist nach Abb. 7 auf Seite 46 bei Frauen im Vergleich zu Männern

- insgesamt gesehen - numerisch leicht erhöht. Jedoch die statistische Untersuchung bezüglich RSV-Antikörper-Titer-Häufigkeit auf signifikante Unterschiede zwischen Männern (n=162) und Frauen (n=54) aus Serumproben von vergleichbaren Monaten (der Monate Oktober, November, bzw. beider Monate zusammen) ergab nach χ^2-Test keine statistische Signifikanz. Somit konnte die Hypothese, daß zwischen Männern und Frauen bezüglich der RSV-Ak-Titerhäufigkeit kein signifikanter Unterschied bestünde, nicht verworfen werden.
Es ist außerdem festzustellen, daß in Anbetracht der nur begrenzten Zahl der von mir untersuchten Seren von Männern (n=162) mit meinen dabei erzielten Ergebnissen diesbezüglich keine eindeutige Aussage möglich ist.
Nationalität: Wie aus Abb. 12 auf Seite 52 ersichtlich ist, zeigten sich hier die Unterschiede in Bezug auf die Häufigkeit von Antikörperträgern gegen das RS-Virus am stärksten, wenn man die reinen Zahlen betrachtet: die Ausländerinnen hatten im Vergleich zu den deutschen Frauen (auch derselben Altersgruppe) durchweg höhere Einzeltiter an spezifischen Antikörpern gegen RS-Viren als auch einen deutlich höheren Durchseuchungsgrad (44,0 %) als deutsche Frauen (31,7 %).
Die Untersuchung der Häufigkeit von RSV-Ak-Titern bei 268 deutschen Frauen mit 85 positiven Befunden ergab im Vergleich zu Ausländerinnen (n=93) mit 41 positiven Befunden (siehe dazu Tabelle 7 auf Seite 47) einen statistisch signifikanten Unterschied (nach χ^2-Test mit YATES-Korrektur bei einem Signifikanzniveau $\alpha = 0{,}05$).
Dieser Tatbestand erklärt sich eventuell aufgrund ihres vergleichsweise durchschnittlich geringeren Alters, aufgrund der generell größeren Kinderzahl im Vergleich zu deutschen Frauen und wohl auch aufgrund des im allgemeinen niedereren sozialen Niveaus und der schlechteren ökonomischen Situation mit ungünstigeren Wohnverhältnissen und engerem Kontakt der einzelnen Familienmitglieder untereinander.
Sozio-ökonomische Stellung: Der Vergleich der Titerhäufigkeit von RSV-Antikörpern bei 162 Arbeiterinnen (bzw. Frauen von Arbeitern) mit 71 positiven Befunden mit 199 Nichtarbeiterinnen (bzw. Frauen von Nichtarbeitern) mit 55 positiven Be-

funden ergab ebenfalls einen signifikanten Unterschied (nach χ^2-Test mit YATES-Korrektur und einem Signifikanzniveau $\alpha = 0{,}05$).
Es scheint also, daß es neben dem bevölkerungsspezifischen auch ein schichtspezifisches Merkmal der Ausbreitung und des Durchseuchungsgrades mit RS-Viren innerhalb einer Population gibt.
Dies ist wohl darauf zurückzuführen, daß in den Familien der Frauen mit niedrigerem sozialen Niveau durchweg eine sehr viel größere Kinderzahl vorliegt als in den Familien aus den sozial höheren Bevölkerungsschichten, wie aus der Tabelle 9 auf Seite 51 hervorgeht.
Unterschiedliche Kinderzahl: Die Untersuchung von 361 Serumproben deutscher und ausländischer Frauen auf RSV-Antikörper-Titer ergab bei der Auswertung nach χ^2-Test bei Personen mit Kindern (n=219) keine statistisch signifikanten Unterschiede im Hinblick auf unterschiedlich große Kinderzahl.
Somit kann die Hypothese, daß zwischen der Kinderzahl (bei Personen mit Kindern) und der Häufigkeit von RSV-Antikörper-Titern kein statistisch signifikanter Unterschied besteht, nicht verworfen werden.
Wohl aber zeigten sich nach χ^2-Test signifikante Unterschiede zwischen der Gruppe mit Kindern (n=219) unterschiedlicher Anzahl und jener, die überhaupt keine Kinder hatte (n=142) mit einem Signifikanzniveau $\alpha = 0{,}005$ und YATES-Korrektur in Bezug auf die Häufigkeit von RSV-Antikörper-Titern.
Aufgrund der in Tabelle 10 auf Seite 51 dargestellten Untergliederung in 219 Serumproben von Frauen mit Kindern, die 90 positive Befunde aufwiesen, und in 142 Serumproben von Frauen ohne Kinder mit 36 positiven Befunden ergaben sich folgende Untergruppen: 113 Arbeiterinnen (bzw. Frauen von Arbeitern) mit Kindern hatten 56 positive Titer, 49 Arbeiterinnen ohne Kinder lediglich 15 positive Titer. Ihre Untersuchung auf statistische Signifikanz im Hinblick auf RSV-Ak-Titerhäufigkeit ergab mit χ^2-Test und YATES-Korrektur ein Signifikanzniveau $\alpha = 0{,}05$. Die RSV-Ak-Titerhäufigkeit war bei Arbeiterinnen mit Kindern damit statistisch signifikant höher als bei solchen ohne Kinder.

Ebenso verhielt es sich bei 148 deutschen Frauen mit Kindern bei 55 positiven Titern und 120 deutschen Frauen ohne Kinder beim Vorliegen von 30 positiven Titern bezüglich der Häufigkeit von Antikörper-Titern gegen RS-Viren (Signifikanzniveau $\alpha = 0{,}05$).
Die vergleichende Betrachtung zwischen 106 Nichtarbeiterinnen (bzw. Frauen von Nichtarbeitern) mit Kindern bei 34 positiven Befunden und 93 solchen ohne Kinder bei 21 positiven Befunden ergab nach dem χ^2-Test keine statistisch signifikanten Unterschiede im Hinblick auf die RSV-Ak-Titerhäufigkeit.
Der Vergleich der 35 positiven Titer bei 71 Ausländerinnen mit Kindern mit den 6 positiven Titern bei 22 Ausländerinnen ohne Kinder war nach χ^2-Test mit YATES-Korrektur nicht signifikant, wogegen er ohne YATES-Korrektur bei einem Signifikanzniveau $\alpha = 0{,}1$ gerade noch statistisch signifikant war.
Offensichtlich hat der Tatbestand, ob Kinder vorhanden sind oder nicht, bei den untersuchten Frauenseren den größten Einfluß auf die Verbreitung des RS-Virus. Die Frauen aus denjenigen Familien mit kleineren Kindern und Säuglingen hatten signifikant höhere Durchseuchungs-Titer und waren auch weitaus häufiger antikörper-positiv auf RS-Viren als Frauen der Vergleichsgruppe mit ähnlichem sozialem Status und aus derselben Altersgruppe, aber ohne Kinder.
Das Vorhandensein von Kleinkindern in einer Familie dürfte ein entscheidender Faktor für die Häufigkeit von Re-Infektionen mit RS-Viren sein, die dann nachweisbare, komplementbindende Antikörper-Titer gegen diese Viren in mäßig erhöhten Werten auch im Serum der Erwachsenen, also der Mütter, ergeben, wie es in den untersuchten Seren dieser Frauen deutlich zum Ausdruck kam.
Jahreszeit: Bei der Betrachtung des untersuchten Serummaterials (siehe Tabelle 11 auf Seite 53), das aus gesammelten Serumproben des Zeitraumes von März 1975 bis Juli 1976 entstammt und somit jahreszeitlich verschiedene Zeiträume in Form einzeln aufgeschlüsselter Monate umfaßt, ließ sich bezüglich des Auftretens von komplementbindenden Antikörpern gegen das RS-Virus eindeutig ein Zusammenhang mit unterschiedlichen Jahreszeiten nachweisen, der weitgehend in Übereinstimmung steht mit

entsprechenden Angaben zahlreicher anderer Autoren (HALL, 1976; HENIGST, 1975; BRODIE, 1973; KIM, 1973; BRANDT, 1973; ASSAAD and COCKBURN, 1974 etc.).

Dabei waren die meisten positiven Befunde bei meinen Untersuchungen im Frühjahr und im Herbst (was wiederum im Einklang steht mit den Angaben der oben aufgeführten Autoren) mit dem Spitzenmonat (= Monat des häufigsten Auftretens von Antikörpern gegen RS-Viren) November, und dem April als dem Monat mit dem zweithäufigsten Auftreten, zu verzeichnen, bei einem deutlichen Tief in den Sommermonaten Juni und Juli (der Jahre 1975 und 1976), wo nur sehr wenige RSV-Antikörper-Träger (meist mit geringer Titerhöhe) serologisch in der KBR ermittelt werden konnten.

Auch KIM, BRANDT et al., 1973, geben in ihren Untersuchungen an über 15 000 Säuglingen und Kleinkindern in einem Intervall von über 12 Jahren (Oktober 1957 bis Juni 1970) mit 11 jährlich aufeinanderfolgenden RSV-Epidemien an, daß in den Monaten August und September das RS-Virus im wesentlichen nicht vorkam, in der Zeit von Januar bis April am stärksten in der Population aktiv war und im Spätherbst, Winter und Frühjahr bevorzugt auftrat, aber bei ihnen sind - im Gegensatz zu mir - die Spitzenmonate Februar und März.

Bei meinen Untersuchungen (95 Serumproben der Monate März und April) war die Titerhäufigkeit mit 36 positiven Titern im Frühjahr im Vergleich zum Sommer (63 Seren der Monate Juni und Juli) mit 14 positiven Titern signifikant erhöht (nach χ^2-Test bei einem Signifikanzniveau $\alpha = 0{,}1$ mit YATES-Korrektur).

Eine vergleichende Betrachtung von Sommer und Herbst (54 Seren der Monate Oktober und November bei 25 positiven Titern) ergab ebenfalls nach χ^2-Test und YATES-Korrektur bei einem Signifikanzniveau $\alpha = 0{,}025$ einen statistisch signifikanten Unterschied.

Ein Vergleich zwischen Frühjahr und Herbst bezüglich der RSV-Ak-Häufigkeit ergab nach χ^2-Test mit YATES-Korrektur keinen statistisch signifikanten Unterschied.

V. Zusammenfassung

Es wurden zwei Zellinien - HEP-2-Zellen und VERO-Zellen - zur Herstellung von RSV-Antigen verglichen. Die HEP-2-Zellen erwiesen sich als das überlegene System, denn bereits zwei Tage nach der RS-Virus-Inokulation traten lichtmikroskopisch die ersten erkennbaren, virusbedingten cytopathischen Veränderungen auf, und nach 4-5 Tagen war der cytopathische Effekt voll ausgebildet. Die ersten virusbedingten Veränderungen der VERO-Zellen zeigten sich deutlich später, erst 7-8 Tage nach Inokulation derselben Menge desselben RS-Virus-Materials. Im allgemeinen waren die charakteristischen cytopathischen Veränderungen auf HEP-2-Zellen sehr viel stärker und eindeutiger im Sinne der Bildung von syncytialen Riesenzellen ausgebildet als auf VERO-Zellen. Sie waren besonders deutlich ausgeprägt bei jungen, vorher einige Male frisch passagierten HEP-2-Zellen und ergaben dann auch die höchsten RSV-Antigen-Titer in der KBR.

Bei der Präparation des RS-Virus-Antigens nach der Methode von TOMIYANA des unter identischen Bedingungen auf HEP-2- und auf VERO-Zellen gezüchteten RS-Virus-Materials ergaben sich in der vergleichenden KBR unterschiedliche Antigenqualitäten. Das Antigen des auf HEP-2-Zellen gezüchteten RS-Virus erbrachte höhere Titer als das, welches von VERO-Zellen stammte.

Die Austestung verschiedener Präparationstechniken zur Optimierung der RSV-Antigen-Ausbeute (insbesondere der komplementbindenden, zellassoziierten RS-Virus-Komponente) ergab, daß sich die Methode von TOMIYANA als günstiger erwies als die "Inkubationsmethode". Bei der RSV-Antigen-Präparation schnitten alle diejenigen Variationen der Methode von TOMIYANA, insbesondere die "Kombinationsmethode", am besten ab, die die virusinfizierten Wirtszellen aufschließen - entweder durch thermische Brechung über einen zeitlich dicht aufeinanderfolgenden Einfrier- und Auftau-Prozess oder durch mechanische Zerschlagung unter Verwendung von Ultraschall - . Erst dadurch kann eine RSV-Antigen-Menge freigesetzt werden, die einen optimalen Ausfall der KBR garantiert.

Dies beweisen auch die Ergebnisse der vergleichenden KBR der nach zwei prinzipiell verschiedenen Methoden (Methode von TOMIYANA und "Inkubationsmethode") präparierten RSV-Antigene in ihrem unterschiedlichen Empfindlichkeitsgrad gegenüber Meerschweinchen-Immunseren. Die komplementbindenden Antikörperspiegel bei vier immunisierten Meerschweinchen fielen mit der Zeit logarithmisch ab, was ein Erklärungsgrund für die gerade mit diesem Virus häufig bei Menschen beobachteten Re-Infektionen sein könnte.

Die optimalste Präparationsmethode zur Gewinnung des RSV-Antigens lag in einem kombinierten Verfahren aus Präparationsschritten der Methode von TOMIYANA und der "Inkubationsmethode" mit der zusätzlichen Anwendung von Ultraschall zur Zerschlagung der RS-Virus-infizierten Zellen, um dadurch die intrazelluläre RSV-Antigen-Komponente mit ihrer hohen komplementbindenden Aktivität zu gewinnen.

Die mit dem selbst hergestellten RSV-Antigen durchgeführten serologischen Studien über den Durchseuchungsgrad der erwachsenen Bevölkerung mit RS-Viren im Tübinger Raum ergaben eine Abhängigkeit von sozialen, ökonomischen, jahreszeitlichen (die Titer waren am höchsten in den Wintermonaten) und altersmäßigen Faktoren sowie vom Vorhandensein von Kindern. Waren Kinder vorhanden, so hatte eine unterschiedliche Kinderzahl bei vergleichbaren Gruppen keinen signifikanten Einfluß auf das Vorliegen von RSV-Antikörper-Titern. Geschlechtsspezifische Unterschiede der Titerhäufigkeit von statistischer Signifikanz konnten ebenfalls nicht nachgewiesen werden.

Die Untersuchung der Ultrastruktur des RS-Virus mit dem Transmissions-Elektronenmikroskop an Ultradünnschnittpräparaten enthüllten vor allem die "budding areas" an den Zellmembranen der mit RS-Viren infizierten HEP-2-Zellen. Die in der Literatur beschriebenen runden und filamentösen Formen des RS-Virus konnten ebenfalls elektronenoptisch nachgewiesen werden.

Die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigten an den dargestellten Oberflächen der virusinfizierten HEP-2-Zellen das - wie mit einem Saum überzogene - fransenartige Aussehen der Membran aufgrund der, durch das RS-Virus beding-

ten, filamentösen Ausläufer, die verlängerten Nucleocapsiden entsprechen. Sie demonstrieren ebenfalls den nach verschiedenen Zeiträumen seit der Virusinokulation auftretenden unterschiedlichen Ausprägungsgrad des für das RS-Virus typischen CPE's. Während anfangs Riesenzellen mit dichten Membranfransen unter dem Einfluß des RS-Virus bei den HEP-2-Zellen auftreten, erscheinen später dann vorwiegend degenerative - ebenfalls durch das Virus und/oder durch Autolyse der Zellen bedingte - sich vor allem an der Wirtszellmembran abspielende Veränderungen.

VI. Literaturverzeichnis

1. ADAMCZYK, G. und B.: Zur Epidemiologie und Diagnostik des RS-Virus, Kinderärztl. Praxis, Leipzig 39, 225-232 (1971).
2. ADAMCZYK, G. und B.: Vergleichende Untersuchungen mit dem Neutralisationstest und der Komplementbindungsreaktion bei der Diagnostik von RS-Virus-Infektionen, Zeitschr. für ges. Hyg. 17, 617-619 (1971).
3. AHERNE, W., BIRD, T., COURT, S.D.M., GARDNER, P.S. and MC.QUILLIN, J.: Pathological changes in virus infections of the lower respiratory tract in children, J. Clin. Path. 23, 7 (1970).
4. AITKIN, C.J.D., MOFFAT, M.A.J. and SUTHERLAND, J.A.W.: Respiratory illness and virus infection in an Edinburgh nursery, J. Hyg., Camb. 65, 25 (1967).
5. ANDERSON, J.M. and BEEM, M.O.: Use of human diploid cell cultures for primary isolation of respiratory syncytial virus, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 121, 205 (1966).
6. ANDREW, J.D. and GARDNER, P.S.: Occurence of respiratory syncytial virus in acute respiratory diseases in infancy, Br. Med. J. 2, 1447 (1963).
7. ASSAAD, F. and COCKBURN, W.C.: A seven year study of WHO virus laboratory reports on respiratory viruses, Bull. World Health Organ. 51, 437-445 (1974).
8. BÄCHI, Th. and HOWE, C.: Morphogenesis and ultrastructure of respiratory syncytial virus, J. of Virol. 12, 1173-1180 (1973).
9. BALDRIDGE, P. and SENTERFIT, L.B. (introduced by CHANOCK, R.M.): Persistent Infection of Cells in Culture by Respiratory Syncytial Virus, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 151, 684-688 (1976).
10. BEEM, M.O., WRIGHT, F.H., HAMRE, D., EGERER, R. and OEHME, M.: Association of chimpanzee coryza agent with acute respiratory disease in children, New Engl. J. Med. 263, 523 (1960).

11. BEEM, M.O., WRIGHT, F.H., FASAN, D.M. et al.: Observations on the etiology of acute bronchiolitis in infants, J. Pediatr. 61, 864-869 (1962).

12. BEEM, M.O.: Acute respiratory illness in nursery school children: a longitudinal study of the occurence of illness and respiratory viruses, Am. J. Epidem. 90, 30 (1969).

13. BERGLUND, B., VIHMA, L. and WICKSTRÖM, J.: Respiratory syncytial virus studies on children hospitalized during an outbreak of respiratory illness in Finland, Am. J. Epidem. 81, 271 (1965).

14. BERGLUND, B. et al.: Isolation of respiratory syncytial virus from middle ear exsudates of infants, Arch. Dis. Child. 41, 554-555 (1966).

15. BERGLUND, B. and STRAHLMANN, C.H.: Respiratory syncytial virus infections in hospitalized children: evaluation of virus isolation and complement fixation techniques in the virological diagnosis: clinical and epidemiological characteristics, Acta paediat. scand. 56, 269 (1967).

16. BERGLUND, B., MÄNTYJÄRVI, R. and SALMI, A.: Neutralizing, complement fixing and precipitating antibody response of guinea pigs to intranasal and intracardiac Respiratory Syncytial Virus inoculations, Ann. Med. Exp. Fenn. 45, 193 (1967).

17. BERTHIAUME, L., JONCAS, J. and PAVILANIS, V.: Comparative Structure, Morphogenesis and Biological Characteristics of the Respiratory Syncytial Virus and the Pneumonia Virus of Mice (PVM), Archiv für die ges. Virusforsch. 45, 39-51 (1974).

18. BLOTH, B., ESPMARK, A., NORRBY, E. and GARD, S.: The ultrastructure of respiratory syncytial (RS)-virus, Arch. ges. Virusforsch. 13, 582-586 (1963).

19. BRANDT, C.D., KIM, H.W., ARROBIO, J.O., JEFFRIES, B.C., WOOD, S.C., CHANOCK, R.M. and PARROTT, R.H.: Epidemiology of respiratory syncytial virus infection in

Washington, D.C. III. Composite analysis of eleven consecutive yearly epidemics, Am. J. Epidemiol. 98, 355-364 (1973).

20. BRODIE, H.R. and SPENCE, L.P.: Respiratory syncytial virus infections in children in Montreal: a retrospective study, Can. Med. Assoc. J. 109, 1199-1201 (1973).

21. BRUNNEMANN, H., AUGSTEN, K., MÜLLER, Th. and URBACH, H.: The RS-virus-infected cell in vitro. I. The nucleocytoplasmic (P/N) ratio following infection with the Respiratory Syncytial Virus, Exp. Path. Jena, Bd. 7, 254-257 (1972).

22. CAUL, E.O., JACOBS, J.W. and CLARKE, S.K.R.: Bovine-testis cells for routine isolation of respiratory syncytial virus from infants, J. Med. Microbiol. 7, 301-304 (1974).

23. CENTER FOR DISEASE CONTROL: Reported Morbidity and Mortality in the USA, 1973, Vol. 22, 4 (1974).

24. CHANOCK, R.M., ROIZMAN, B. and MYERS, R.: Recovery from infants with respiratory illness of virus related to chimpanzee coryzal agent (CCA): isolation, properties and characterization, Amer. J. Hyg. 66, 281 (1957).

25. CHANOCK, R.M., KIM, W.H., VARGOSKO, A.J., DELEVE, A., JOHNSON, K.M., CUMMING, C. and PARROTT, R.H.: Respiratory syncytial virus. I. Virus recovery and other observations during 1960 outbreak of bronchiolitis pneumonia and other minor respiratory diseases in children, J. A. M. A. 176, 647 (1961).

26. CHANOCK, R.M., PARROTT, R.H., VARGOSKO, A.J. et al.: IV. Respiratory Syncytial Virus, Am. J. of Public Health 52, 918 (1962).

27. CHANOCK, R.M.: in Clinical Virology: The Evaluation and Management of Human Viral Infections (R. Debré and J. Celers, ed.) 610, W.B. Saunders, Philadelphia/USA (1970).

28. CLARKE, S.K.R., CORNER, B.D., GAMBIER, D.M., MACRAE, J. and PEACOCK, D.B.: Viruses associated with the acute respiratory infections, Br. med. J. 1, 1536 (1964).

29. MC.CLELLAND, L., HILLEMAN, M.R., HAMPARIAN, V.V. et al.: Studies of acute respiratory illnesses caused by respiratory syncytial virus. II. Epidemiology and assessment of importance, N. Engl. J. Med. 264, 1169 (1961).

30. COATES, H.V., KENDRICK, L. and CHANOCK, R.M.: Antigenic differences between two strains of respiratory syncytial virus, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 112, 958 (1963).

31. COATES, H.V., FORSYTH, B.R. and CHANOCK, R.M.: Biophysical studies of respiratory syncytial virus. I. Density of respiratory syncytial virus and associated complement-fixing antigens in a cesium chloride density gradient, J. Bact. 91, 1263 (1966).

32. COMPANS, R.W., HARTER, D.H. and CHOPPIN, P.W.: Studies on pneumonia virus of mice (PVM) in cell culture. II. Structure and morphogenesis of the virus particle, J. Exp. Med. 126, 267-275 (1967).

33. DAVIS, D.J., MC.GLYNN, F.D. and WILLIAMSON, L.M.: Semi-automated desensitization as a treatment for genuinely fearful subjects, Behav. Res. Ther. 11, 313-315 (1973).

34. DITCHBURN, R.K., MC.QUILLIN, J. and GARDNER, P.S. et al.: Respiratory syncytial virus in hospital cross-infection, Br. Med. J. 3, 671-673 (1971).

35. FORSYTH, B.R., COATES, H.V. and CHANOCK, R.M.: Biophysical studies of Respiratory Syncytial Virus. II. Identification of two soluble complement-fixing antigens of Respiratory Syncytial Virus, J. Bact. 91, 1270 (1966).

36. FRANSEN, H., STERNER, G., FORSGREN, M., HEIGL, Z., WOLONTIS, S., SVEDMYR, A. and TUNEVALL, G.: Acute lower respiratory illness in elderly patients with

respiratory syncytial virus infection, Acta Med. Scand. 182, 323 (1967).

37. FRIEDEWALD, W.T., FORSYTH, B.R., SMITH, C.B., GHARPURE, M.A. and CHANOCK, R.M.: Low-temperature-grown RS-virus in adult volunteers, J. A. M. A. 204, 690-694 (1968).
38. FUKUMI, H.: Meaning of circulating antibody titers in the infections of Parainfluenza-3-Virus and RS-Virus, Dev. Biol. Stand. 28, 159-166 (1975).
39. GARDNER, P.S., TURK, D.C., AHERNE, W.S., BIRD, T., HALDAWAY, M.D. and COURT, S.D.M.: Deaths associated with respiratory tract infection in childhood, Brit. Med. J. 4, 316 (1967).
40. GARDNER, P.S. and MC.QUILLIN, J.: Application of immunofluorescent antibody technique in rapid diagnosis of respiratory syncytial virus infection, Brit. Med. J. 3, 340 (1968).
41. GARDNER, P.S., MC.QUILLIN, J. and MC.GUCKIN, R.: The late detection of respiratory syncytial virus in cells of respiratory tract by immunofluorescence, J. Hyg. (Camb.) 68, 575 (1970).
42. GHARPURE, M.A., WRIGHT, P.F. and CHANOCK, R.M.: Temperature-sensitive mutants of respiratory syncytial virus, J. Virol. 3, 414 (1969).
43. GRAY, K.G., MC.FARLANE, D.E. and SOMMERVILLE, R.G.: Direct immunofluorescent identification of respiratory syncytial virus in throat swabs from children with respiratory illness, Lancet 1, 446 (1968).
44. GRAYSTON, J.T., WOODBRIDGE, R.L. and WANG, S.: Trachoma vaccine studies on Taiwan, ANN. NY. Acad. Sci. 98, 352 (1962).
45. HALL, C.B., DOUGLAS, R.G.Jr. and GEIMAN, J.M.: Quantitative Shedding Patterns of Respiratory Syncytial Virus in Infants, J. of Infect. Dis. 132, 151-156 (1975).

46. HALL, C.B., GEIMAN, J.M., BIGGAR, R., KOTOK, D.I., HOGAN, P.M. and DOUGLAS, R.G.Jr.: Respiratory syncytial virus infections within families, N. Engl. J. Med. 294, 414-419 (1976).

47. HAMBLING, M.H.: Survival of the respiratory syncytial virus during storage under various conditions, Br. J. exp. Path. 45, 647 (1964).

48. HAMBLING, M.H.: Antibody response in guinea pigs following intranasal inoculation of Respiratory Syncytial Virus, Path. Bact. 91, 625 (1966).

49. HARTER, D.H. and CHOPPIN, P.W.: Studies on pneumonia virus of mice (PVM) in cell culture. I. Replication in baby hamster kidney cells and properties of the virus, J. Exp. Med. 126, 251-266 (1967).

50. HENIGST, W.: Respirationstrakt-Infektionen durch Viren bei Kleinkindern, Med. Klin. 70, 1831-1836 (1975).

51. HODES, D.S., SCHAUF and CHANOCK, R.M.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 146, 287 (1974).

52. HOLZEL, A., PARKER, L., PATTERSON, W.H., CARTMEL, D., WHITE, L.L.R., PURDY, R., THOMPSON, K.M. and TOBIN, J.O.: Virus isolations from throats of children admitted to hospital with respiratory and other diseases, Manchester 1962-64, Br. Med. J. 1, 614 (1965).

53. JACOBS, J.W., PEACOCK, D.B., CORNER, B.D., CAUL, E.O. and CLARKE, S.K.R.: Respiratory syncytial and other viruses associated with respiratory disease in infants, Lancet 1, 871 (1971).

54. JAWETZ, E., MELNICK, J.L. und ADELBERG, E.A.: Medizinische Mikrobiologie im Kapitel "RS-Virus", 594-595 (1977); Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York.

55. JONCAS, J., BERTHIAUME, L. and PAVILANIS, V.: The structure of the respiratory syncytial virus, Virology 38, 493-496 (1969).

56. JORDAN, R.: Growth characteristics of RS-virus, J. of Immunol. 88, 581 (1962).

57. KAPIKIAN, A.Z., MITCHELL, R.H.and CHANOCK, R.M.: An epidemiologic study of altered clinical reactivity to respiratory syncytial virus infection in children previously vaccinated with an inactivated RS-virus vaccine, Americ. J. Epidem. 89, 405-421 (1969).

58. KIM, H.W., CANCHOLA, J.G., BRANDT, C.D., PYLES, G., CHANOCK, R.M., JENSEN, K. and PARROTT, R.H.: Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine, Americ. J. Epidem. 89, 422-434 (1969).

59. KIM, H.W., BELLANTI, J.A., ARROBIO, J.O., MILLS, J., BRANDT, C.D., CHANOCK, R.M. and PARROTT, R.H.: Respiratory syncytial virus neutralizing activity in nasal secretions following natural infection, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 131, 658 (1969).

60. KIM, H.W., ARROBIO, J.O., PYLES, G., BRANDT, C.D., CAMARGO, E., CHANOCK, R.M. and PARROTT, R.H.: Clinical and immunological response of infants and children to administration of low-temperature adapted respiratory syncytial virus, Pediat. 48, 745 (1971).

61. KIM, H.W., ARROBIO, J.O., BRANDT, C.D., JEFFRIES, B.C., PYLES, G., REID, J.L., CHANOCK, R.M. and PARROTT, R.H.: Epidemiology of respiratory syncytial virus infection in Washington, D.C. I. Importance of the virus in different respiratory tract disease syndromes and temporal distribution of infection, Americ. J. Epidemiol. 98, 216-225 (1973).

62. KNIGHT, V.: Viral and mycoplasmal infections of the respiratory tract, chapter 8: respiratory syncytial viruses, Lea and Febiger-Verlag, Philadelphia/USA (1973).

63. KRAVETZ, H.M., KNIGHT, V., CHANOCK, R.M., MORRIS, J.A., JOHNSON, K.M.. RIFKIND, D. and UTZ, J.P.: Respiratory syncytial virus. III. Production of illness and clinical observations in volunteers, J. A. M. A. 176, 657 (1961).

64. LAW, T.J. and HULL, R.N.: The stabilizing effect of sucrose upon respiratory syncytial virus infectivity, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 128, 515 (1968).

65. MC.LEAN, D.M., KETTYLS, G.D.M., HINGSTON, J. et al.: Atypical measles following immunization with killed measles vaccine, Can. Med. Assoc. J. 103, 743 (1970).

66. MC.LEAN, D.M.: Pediatric infections with respiratory syncytial virus, Can. Med. Assoc. J. 109, 1181-1182 (1973).

67. LEVINE, S., BUTHALA, D.A. and HAMILTON, R.D.: Late stage synchronization of respiratory syncytial virus replication, Virology 45, 390-400 (1971).

68. LEWIS, F.A., ROE, M.L.and LEHMANN, N.I.: A syncytial virus associated with epidemic disease of the lower respiratory tract in infants and young children, Med. J. Aust. 2, 932 (1961).

69. MORRIS, J.A., BLOUNT, R.E.Jr. and SAVAGE, R.E.: Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 92, 544 (1956).

70. NAGAHAMA, H., ELLER, J.J., FULGINITI, V.A. and MARKS, M.: Direct immunofluorescent studies of infection with respiratory syncytial virus, J. Infect. Dis. 122, 260 (1970).

71. NELIGAN, G.A., STEINER, H., GARDNER, P.S. et al.: Respiratory syncytial virus infection of the newborn, Br. Med. J. 3, 146 (1970).

72. NORRBY, E., MARUSYK, H. and ORVELL, C.: Morphogenesis of respiratory syncytial virus in a green monkey kidney cell line (Vero), J. Virol. 6, 237-242 (1970).

73. PARROTT, R.H., KIM, H.W., BRANDT, C.D. and CHANOCK, R.M.: Respiratory syncytial virus in infants and children, Preventive Med. 3, 473-487 (1974).

74. RECHSTEINER, J.: Thermal inactivation of respiratory syncytial virus in water and hypertonic solutions, J. Gen. Virol. 5, 397 (1969).

75. REILLY, C.M., STOKES, J. Jr., MC.CLELLAND, L., CORNFELD, D., HAMPARIAN, V.V., KETLER, A. and HILLEMAN, M.: Studies of acute respiratory illness caused by respiratory syncytial virus. III. Clinical and laboratory findings, New Eng. J. Med. 264, 1176 (1961).

76. RICHMAN, A.V., PEDREIRA, F.A. and TAURASO, N.M.: Attempts to demonstrate hemagglutination and hemadsorption by respiratory syncytial virus, Appl. Microbiol. 21, 1099-1100 (1971).

77. SANDOW, D., SCHAAL, D., SCHMIDT, J., DITTMANN, S., HORN, M. und KÜHN, H.: Zur Bedeutung des RS-Virus als Krankheitserreger beim Menschen, Zeitschr. für Erkrank. d. Atmungsorg., Leipzig 136, 65-72 (1972).

78. SCHERBAUM, W.: Dissertation über:"Serologisch-epidemiologische Untersuchungen mit Hilfe der Komplementbindungsreaktion. Respiratorische Viren im Raume Tübingen" (1975).

79. SOMMERVILLE, R.G.: Respiratory syncytial virus in acute exacerbation of chronic bronchitis, Lancet 2, 1247 (1963).

80. STOTT, E.J., BELL, E.J., EADIE, M.B., ROSS, C.A.C. and GRIST, N.R.: A comparative virological study of children in hospital with respiratory and diarrhoeal illnesses, J. Hyg. (Camb.) 65, 9 (1967).

81. STURDY, P., MC.QUILLIN, J. and GARDNER, P.S.: A comparative study of methods for the diagnosis of respiratory virus infections in childhood, J. Hyg. (Camb.) 67, 659-670 (1969).

82. SUTO, T., YANO, N., IKEDA, M., MIYAMOTO, M., TAKAI, S., HINUMA, Y. and ISHIDA, N.: Respiratory syncytial virus infection and its serologic epidemiology, Americ. J. Epidem. 82, 211 (1965).

83. TOBIN, J.O.H.: The isolation of respiratory syncytial viruses from children in hospital in South east Lancashire, Proc. R. Soc. Med. 56, 991 (1963).

84. TOMIYANA, T. vom Laboratory of Microbiology, University of Tokyo, Branch Hospital (Conversaziones, Madrid, mit GERTH, H.J., Prof. Dr. med., Direktor der Virologischen Abteilung des Hygiene-Institutes der Universität Tübingen) (1975).

85. WATERSON, A.P. and HOBSON, D.: Relationship between respiratory syncytial virus and Newcastle disease-parainfluenza group, Br. Med. J. 2, 1166 (1962).

86. WILCZYNSKI, J.: RS-Virus Components. II. Antigenicity, Acta Microbiol. Pol. 25, 139-143 (1976).

87. MC.WILLIAM, K.: Growth of Respiratory Syncytial Virus in RK_{13}Cells (Letter to the Editor). J. Clin. Pathol., London 27, 432 (1974).

88. WRIGHT, P.F., MILLS, V.J. and CHANOCK, R.M.: Evaluation of a temperature-sensitive mutant of respiratory syncytial virus in adults, J. Infect. Dis. 124, 505-511 (1971).

89. WRIGHT, P.F., GHARPURE, M.A., HODES, D.S. and CHANOCK, R.M.: Genetic studies of respiratory syncytial virus temperature-sensitive mutants, Arch. ges. Virusforsch. 41, 238-247 (1973).

90. WRIGHT, P.F., SHINOZAKI, T., FLEET, W., SELL, S.H., THOMPSON, J. and KARZON, D.T.: Evaluation of a live, attenuated respiratory syncytial virus vaccine in infants, J. Pediat. 88, 931-936 (1976).

91. WULFF, H., KIDD, P. and WENNER, H.A.: Respiratory syncytial virus: observation on antigenic heterogenity, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 115, 240 (1964).

92. WUNNER, W.H. and PRINGLE, C.R.: Respiratory Syncytial Virus Proteins, Virology 73, 228-243 (1976).

93. YOUNG, B.J. and MATTHEWS, R.S.: A comparison of HEP-2-cells and a continuous line of human amnion cells for the primary isolation of respiratory syncytial virus, J. med. Lab. Technol. 26, 93 (1969).

Lebenslauf

Am 01. 03. 1951 wurde ich, Werner Heinrich Wurster, als Sohn des Walter Wurster und seiner Ehefrau Clara Wurster, geb. Weber in Mainhardt, Kreis Schwäbisch Hall geboren. In meinem vierten Lebensjahr zogen wir um nach Altbach, Kreis Esslingen, wo ich die Grundschule von 1957 bis 1962 besuchte.
Anschließend absolvierte ich die Realschule in Plochingen, wo ich im Jahr 1967 mit der Mittleren Reife abschloß und dann direkt aufs Schelztorgymnasium nach Esslingen (mathematisch-naturwissenschaftliches Gymnasium) überwechselte. Dort legte ich im Juni 1971 die Reifeprüfung ab.
Es folgte meine Wehrdienstzeit bei der Bundeswehr.
Im April 1973 nahm ich das Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen auf und absolvierte im März 1975 die Ärztliche Vorprüfung. Am 30. März 1976 legte ich den 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung ab. Den 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung bestand ich am 17. 03. 1978. Anschließend begann am 17. 04. 1978 für mich die Ausbildung im Praktischen Jahr, wo ich zunächst bis zum 07. 08. 1978 als Internatsstudent in der Neurologischen Universitätsklinik in Tübingen tätig war. Danach absolvierte ich bis zum 25. 03. 1979 die Fächer Innere Medizin und Chirurgie am Robert-Bosch-Krankenhaus in Stuttgart.
Den schriftlichen Teil des 3. Abschnitts der Ärztlichen Prüfung legte ich am 19. April 1979 in Reutlingen und den mündlichen Teil am 25. April 1979 in Stuttgart ab und bestand damit die Ärztliche Prüfung am 25. 04. 1979.